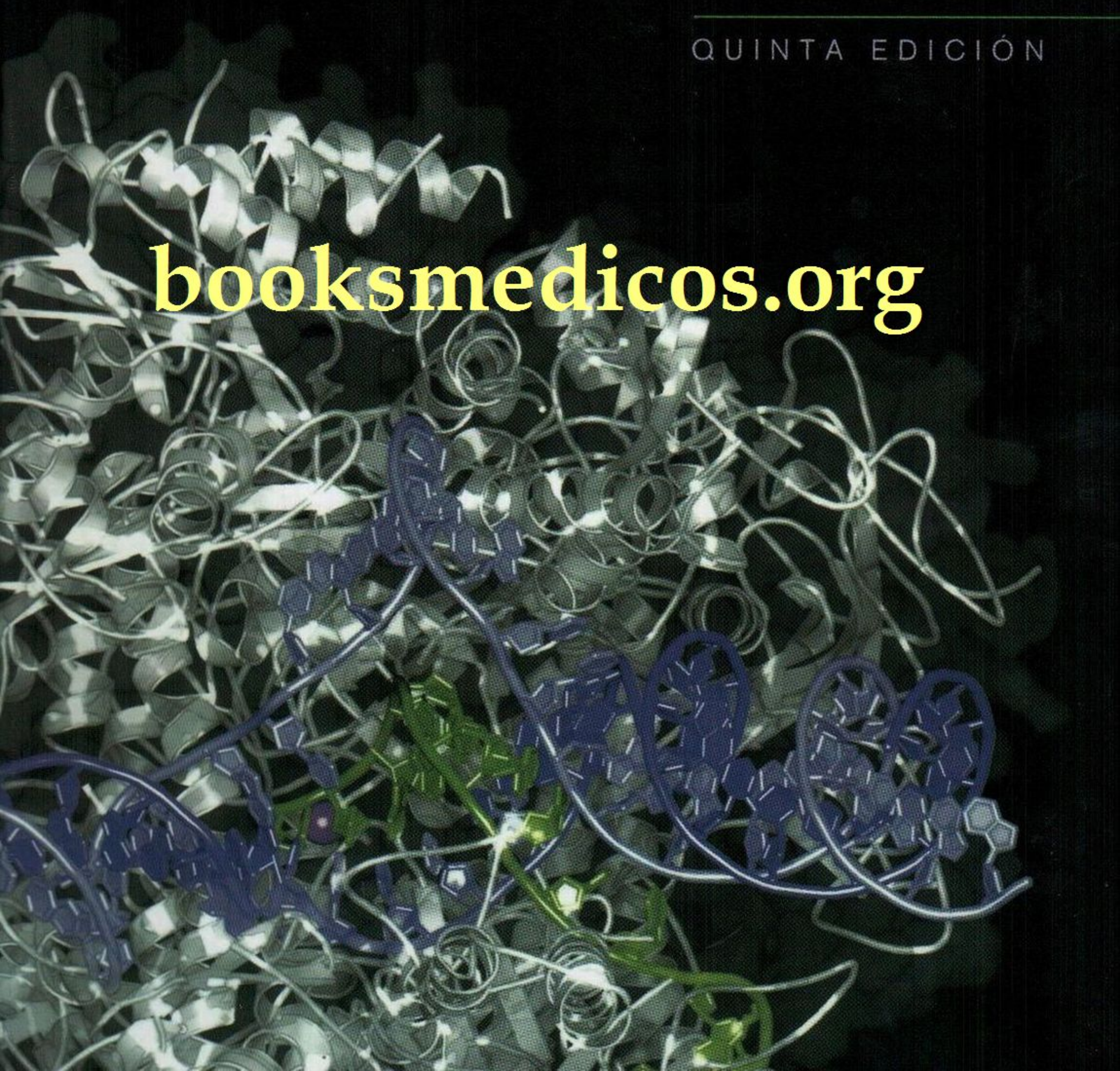
LEHNINGER

PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA

David L. Nelson
Michael M. Cox

QUINTA EDICIÓN



LEHNINGER

PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA

'or'

LEHNINGER

PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA

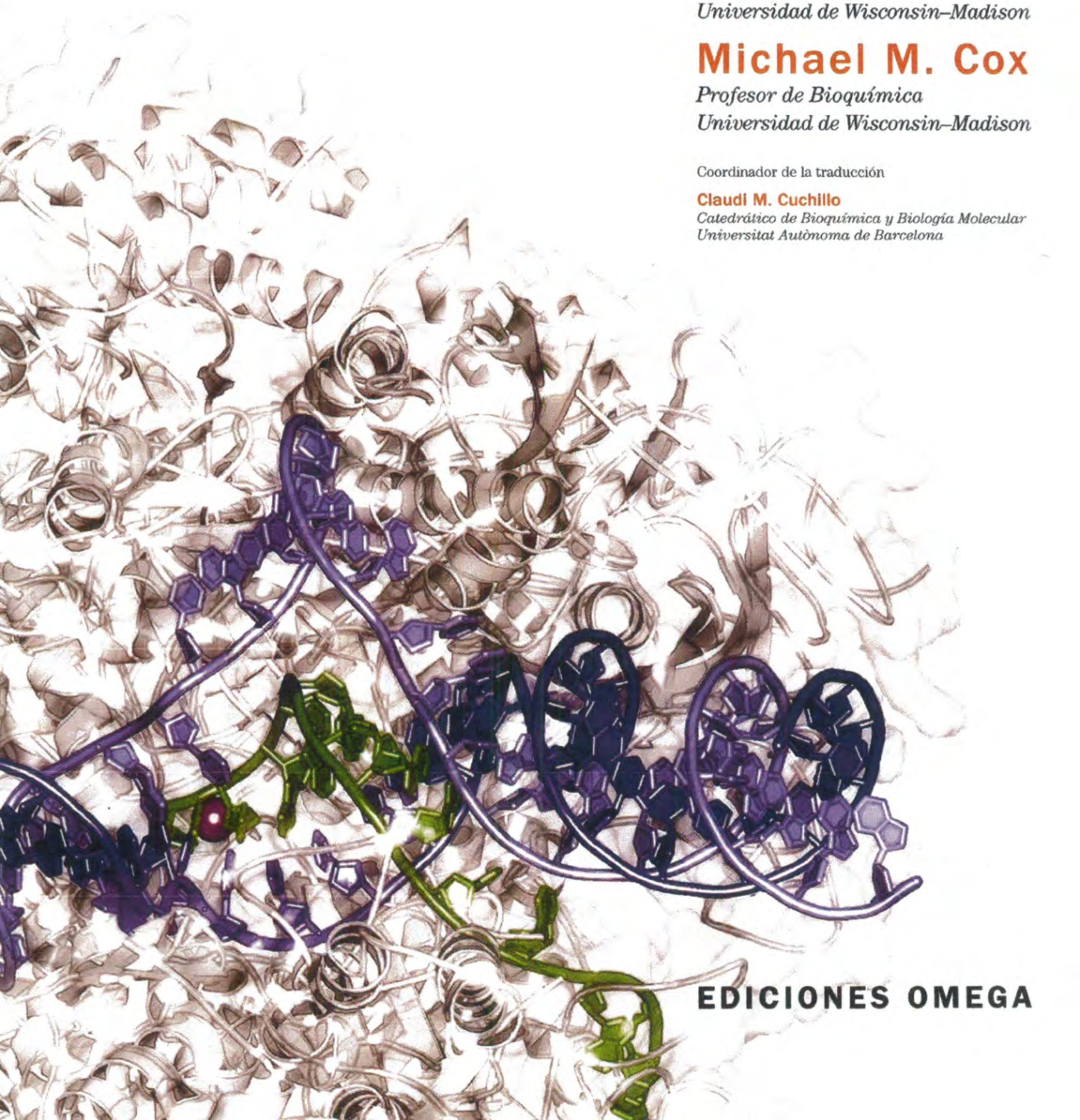
QUINTA EDICIÓN

David L. Nelson
Profesor de Bioquímica
Universidad de Wisconsin–Madison

Michael M. Cox
Profesor de Bioquímica
Universidad de Wisconsin–Madison

Coordinador de la traducción

Claudi M. Cuchillo
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona



EDICIONES OMEGA

La edición original de esta obra ha sido publicada en inglés en Estados Unidos por W.H. Freeman and Company, New York y Basingstoke, con el título

LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY, FIFTH EDITION

Traducción
Claudi M. Cuchillo Foix
Pere Suau León
Josep Vendrell Roca

Directora del proyecto: Elizabeth Geller
Directora de fotografía: Bianca Moscatelli
Búsqueda de fotografías: Dena Betz
Diseño del libro y de la cubierta: Vicki Tomaselli
Coordinadora de las ilustraciones: Susan Timmins
Ilustraciones: H. Adam Steinberg; Network Graphics
Gráficos moleculares: H. Adam Steinberg; Jean-Yves Sgro

Ilustración de la cubierta: RNA polimerasa II de la levadura unida al DNA en el momento de transcribirla en forma de RNA. Imagen creada por H. Adam Steinberg utilizando PDB ID 1I6H modificada por Seth Darst.

Plató, 26 - 08006 Barcelona
www.ediciones-omega.es

ISBN 978-84-282-1486-5
Depósito legal: B. 22.571-2009
Printed in Spain
EGEDSA - Sabadell

A nuestros maestros

Paul R. Burton
Albert Finholt
William P. Jencks
Eugene P. Kennedy
Homer Knoss
Arthur Kornberg
I. Robert Lehman
Earl K. Nelson
David E. Sheppard
Harold B. White

Acerca de los autores

David L. Nelson, natural de Fairmont, Minnesota, obtuvo su licenciatura en química y biología en el St. Olaf College en 1964. Se doctoró en bioquímica en la Stanford Medical School con Arthur Kornberg, siendo después investigador posdoctoral en la Harvard Medical School con Eugene P. Kennedy, que fue uno de los primeros estudiantes licenciados de Lehninger. Nelson se incorporó a la Universidad de Wisconsin-Madison en 1971, siendo nombrado catedrático de bioquímica en 1982. Es director del Center for Biology Education en la Universidad de Wisconsin-Madison.

La investigación de Nelson se ha centrado sobre las transducciones de señal que regulan el movimiento de los cilios y la exocitosis en el protozoo *Paramecium*. Los enzimas de las transducciones de señal, incluidas una serie de proteínas quinasa, constituyen el objetivo principal de sus estudios. Su grupo de investigación utiliza la purificación enzimática, técnicas inmunológicas, microscopia electrónica, genética, biología molecular y electrofisiología para estudiar estos procesos.

Dave Nelson tiene una trayectoría distinguida como profesor y como director de investigación. Durante 36 años ha impartido un curso intensivo de bioquímica para estudiantes avanzados en esta materia así como para licenciados en ciencias biológicas. También ha impartido un curso de bioquímica para estudiantes de enfermería y cursos para licenciados sobre estructura y función de las membranas y sobre neurobiología molecular. Ha dirigido numerosas tesis de licenciatura y de doctorado, y ha recibido distinciones por la excelencia de su docencia tales como el Dreyfus Teacher-Scholar Award, el Atwood Distinguished Professorship y el Unterkofler Excellence in Teaching Award del University of Wisconsin System. En 1991-1992 fue profesor visitante de química y biología en el Spelman College. Su segundo tema favorito es la historia y ha empezado a enseñar la historia de la bioquímica a estudiantes de licenciatura y a coleccionar instrumentos científicos.

Michael M. Cox nació en Wilmington, Delaware. En su primer curso de bioquímica, la *Bioquímica* de Lehninger le causó gran impacto y fue decisivo para redirigir su fascinación hacia la biología e inspirarle a seguir la carrera de bioquímica. Después de licenciarse en la Universidad de Delaware en 1974, Cox se trasladó a la Universidad Brandeis donde realizó su tesis doctoral con William P. Jencks; después fue a Stanford en 1979 para proseguir sus estudios posdoctorales con I. Robert Lehman. Se trasladó a la Universidad de Wisconsin-Madison en 1983. En el año 1992 fue nombrado catedrático de bioquímica.

En su tesis doctoral estudió la catálisis ácido-base general como modelo de reacciones catalizadas por enzimas. En

David L. Nelson y Michael M. Cox

Stanford, Cox empezó a trabajar sobre los enzimas que intervienen en la recombinación genética. El trabajo se centró especialmente sobre la proteína RecA, diseñando métodos de purificación y de actividad aún usados que han aportado luz sobre los procesos de la migración de rama del DNA. El estudio de los enzimas de la recombinación genética continúa siendo el tema principal de sus investigaciones.

Mike Cox ha coordinado un grupo de investigación numeroso y activo en Wisconsin que ha investigado la enzimología, topología y energética de la recombinación genética. Un foco principal ha sido el mecanismo del intercambio de cadenas del DNA facilitado por la proteína RecA, el papel del ATP en el sistema RecA y la regulación de la reparación en la recombinación del DNA. Actualmente, parte del programa de investigación se ha focalizado en organismos con una fuerte capacidad de reparación del DNA, tales como *Deinococcus radiodurans*, y las aplicaciones de estos sistemas de reparación a la biotecnología. Durante los últimos 24 años ha enseñado (junto con Dave Nelson) un curso general de bioquímica y ha intervenido en cursos para licenciados sobre la estructura y topología del DNA, interacciones proteína-DNA y bioquímica de la recombinación. Un proyecto más reciente ha sido la organización de un nuevo curso sobre responsabilidad profesional para estudiantes de primer año de licenciatura. Ha recibido distinciones por su docencia e investigación, entre ellas el Dreyfus Teacher-Scholar Award y el Eli Lilly Award de 1989 en química biológica. Entre sus aficiones se cuentan la jardinería, la enología e intervenir en el diseño de laboratorios.

Nota sobre la naturaleza de la ciencia

En este siglo XXI, una educación científica típica deja a menudo sin manifestar las bases filosóficas de la ciencia o confía en definiciones muy simplificadas. Dado que se propone realizar una carrera científica puede ser útil considerar una vez más los términos **ciencia, científico** y **método científico**.

La **ciencia** es tanto una forma de pensar sobre el mundo natural como la suma de la información y la teoría resultantes de tal manera de pensar. El poder y el éxito de la ciencia fluyen directamente de su dependencia de las ideas que se pueden comprobar: información sobre los fenómenos naturales que se pueden observar, medir y reproducir y teorías que tienen un valor predictivo. El progreso de la ciencia se asienta en una suposición fundacional que a menudo no está explicitada pero que es crucial para la empresa: que las leyes que gobiernan las fuerzas y fenómenos del universo no están sujetas a cambio. El premio Nobel Jacques Monod se refirió a este supuesto básico como el "postulado de la objetividad". Se puede comprender, por tanto, el mundo natural al aplicar un proceso de investigación: el método científico. La ciencia no tendría éxito en un universo que nos hiciese trampas. Aparte del postulado de la objetividad, la ciencia no hace suposiciones inviolables acerca del mundo natural. Una idea científica útil es la que (1) ha sido o se puede sustanciar de manera repetida y (2) se puede utilizar para predecir con precisión nuevos fenómenos.

Las ideas científicas adoptan muchas formas. Los términos utilizados por los científicos para describir estas formas tienen significados muy diferentes de los utilizados por los no científicos. Una *hipótesis* es una idea o presunción que proporciona una explicación razonable y comprobable para una o más observaciones, pero puede carecer de una verificación experimental extensa. Una *teoría científica* es mucho más que una intuición. Es una idea que se ha verificado en cierta medida y que proporciona una explicación para un conjunto de observaciones experimentales. Una teoría se puede comprobar y puede servir de base de nuevos avances e innovaciones. Cuando una teoría científica se ha comprobado de manera repetida y validada en muchos frentes puede ser aceptada.

En un sentido importante, lo que constituye la ciencia o una idea científica viene definido por el hecho de haberse publicado o no en la literatura científica después de una evaluación por pares, es decir, otros científicos activos. Alrededor de 16.000 revistas científicas publican en todo el mundo 1,4 millones de artículos cada año, una rica cosecha de información propiedad, desde el nacimiento, de todo ser humano.

Los **científicos** son individuos que aplican de modo riguroso el método científico para entender el mundo natural. El solo hecho de poseer un título superior en una disciplina científica no hace a uno científico, ni la falta de tal título impide que pueda hacer contribuciones científicas importantes. Un científico ha de estar dispuesto a poner en duda cualquier idea cuando lo piden nuevos descubrimientos. Las ideas aceptadas por un científico han de basarse en observaciones medibles y reproducibles y ha de exponerlas con honestidad.

El **método científico** es, de hecho, una colección de caminos que llevan, todos ellos, al descubrimiento científico. En el camino *hipótesis y experimento* un científico plantea una hipótesis y a continuación la somete a la prueba experimental. Gran parte de los procesos con los que trabajan los bioquímicos se descubrieron de esta forma. La estructura del DNA descubierta por James Watson y Francis Crick condujo a la hipótesis de que el apareamiento de bases es el fundamento de la transferencia de información en la síntesis de polinucleótidos. Esta hipótesis ayudó a inspirar el descubrimiento de las DNA y RNA polimerasas.

Watson y Crick produjeron su estructura del DNA a través de un proceso de *construcción de modelos y cálculos*. No habían experimentos reales, aunque para los cálculos y la construcción de modelos usaron datos obtenidos por otros científicos. Muchos científicos han aplicado el proceso de *exploración y observación* como camino para el descubrimiento. Viajes históricos de descubrimientos (como el de Charles Darwin de 1831 en el H.M.S. *Beagle* entre ellos) ayudaron a cartografiar el planeta, catalogar sus habitantes y cambiar la forma con la que miramos el mundo. Los científicos modernos siguen un camino similar cuando exploran las profundidades oceánicas o lanzan sondas a otros planetas. Un análogo de la hipótesis y experimento es la *hipótesis y deducción*. Crick razonó que ha de existir una molécula adaptadora que facilite la traducción de la información del RNA mensajero en proteína. Esta hipótesis llevó al descubrimiento del RNA de transferencia por Mahlon Hoagland y Paul Zamecnik.

No todos los caminos que llevan al descubrimiento están planificados. La *casualidad* juega, a menudo, un papel. El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y de los catalizadores RNA por Thomas Cech a principios de la década de 1980, fueron descubrimientos debidos al azar, si bien fueron científicos bien preparados los que los explotaron. La *inspiración* también puede llevar a adelantos importantes. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la actualidad una parte central de la biotecnología, fue desarrollada por Kary Mullis después de un destello de inspiración durante un viaje por carretera por California septentrional en 1983.

Esta variedad de caminos para el descubrimiento científico pueden parecer muy diferentes pero tienen varias cosas importantes en común. Se focalizan en el mundo natural. Confían en la *observación reproducible* y/o *experimento*. Todas las ideas, conocimientos y hechos experimentales que surgen de estos esfuerzos se pueden comprobar y reproducir por científicos de cualquier parte del mundo. Todos pueden ser utilizados por otros científicos para construir nuevas hipótesis y realizar nuevos descubrimientos. Todos conducen a información que se incluye adecuadamente en el reino de la ciencia. Conocer nuestro universo requiere trabajo duro. Al mismo tiempo no hay esfuerzo humano más interesante y potencialmente gratificante que probar y, en ocasiones conseguir, entender alguna parte del mundo natural.

Prólogo

La primera edición de *Principios de Bioquímica*, escrita por Albert Lehninger hace veinticinco años, ha servido como punto de partida y modelo de nuestras cuatro ediciones posteriores. A lo largo de este cuarto de siglo, el mundo de la bioquímica ha cambiado enormemente. Hace veinticinco años no se había secuenciado ningún genoma, no se había resuelto por cristalografía ninguna proteína de membrana y no existía ningún ratón genosuprimido. Acababan de descubrirse los ribozimas, se había introducido la tecnología PCR y las arqueobacterias habían sido reconocidas como miembros de un reino separado de las bacterias. Hoy en día se anuncian cada semana nuevas secuencias genómicas, nuevas estructuras proteicas con una frecuencia aún mayor y los investigadores han manipulado genéticamente millares de ratones genosuprimidos diferentes, con enormes promesas de avances en bioquímica, fisiología y medicina básicas. Esta quinta edición contiene la fotografía de 31 premios Nobel que han recibido sus premios en Química o en Fisiología o Medicina desde la primera edición de *Principios de Bioquímica*.

Uno de los retos principales de cada edición ha sido reflejar el alud de información nueva sin hacer el libro abrumador para los estudiantes que se encuentran por primera vez con la bioquímica. Esto ha obligado a cribar cuidadosamente para poder dar énfasis a los principios mientras se transmite el entusiasmo por la investigación actual y su promesa para el futuro. La cubierta de esta nueva edición es un ejemplo de este entusiasmo y promesa: en la estructura de rayos X de la RNA polimerasa vemos el DNA, el RNA y la proteína en sus funciones informadoras, en dimensiones atómicas, captada en el acto central de transferencia de la información.

Estamos en el umbral de una nueva fisiología molecular en la que procesos tales como la excitación de membranas, la acción hormonal, la vista, el gusto, el olfato, la respiración, la contracción muscular y los movimientos celulares serán explicables en términos moleculares y serán accesibles a la disección genética y a la manipulación farmacológica. El conocimiento de las estructuras moleculares de los complejos altamente organizados de la fosforilación oxidativa y de la fotofosforilación, por ejemplo, aportarán de buen seguro un conocimiento más profundo de estos procesos, cruciales para la vida. (Estos desarrollos nos hacen desear volver a ser jóvenes, empezando nuestras carreras en la investigación y docencia bioquímicas. ¡No es sólo nuestro libro que ha adquirido un toque plateado en estos años!)

En las dos últimas décadas nos hemos esforzado continuamente en mantener las cualidades que hicieron del texto original de Lehninger un clásico: escritura clara, explicaciones cuidadosas de conceptos difíciles y comunicación a los estudiantes sobre la forma en la que la bioquímica es entendida y practicada en la actualidad. Hemos escrito juntos durante veinte años y enseñado juntos durante casi veinticinco. Nuestros miles de estudiantes en la Universidad de Wisconsin-Madison durante estos años han sido una fuente inacabable de ideas sobre cómo presentar la bioquímica más claramente; nos han ilustrado e inspirado. Esperamos que esta edición del veinticinco aniversario ilustrará e inspirará a los actuales estudiantes de bioquímica de todas partes y quizá lleve algunos a amar la bioquímica tal como la amamos nosotros.

Principales avances recientes de la bioquímica

Cada capítulo ha sido completamente revisado y puesto al día para incluir los principales avances de la bioquímica, como:

- Conceptos de **proteomas y proteómica** introducidos al principio del libro (Capítulo 1)
- Nueva discusión sobre **enfermedades amiloides** en el contexto del plegamiento de proteínas (Capítulo 4)
- Nueva sección sobre **productos farmacéuticos** desarrollados a partir del conocimiento de mecanismos enzimáticos, utilizando inhibidores de la penicilina y de la proteasa del VIH como ejemplos (Capítulo 6)
- Nueva discusión sobre **análogos de azúcares** como medicamentos que apuntan a la neuramidinasa (Capítulo 7)
- Nuevo material sobre la **proteína fluorescente verde** (Capítulo 9)
- Nueva sección sobre **lipidómica** (Capítulo 10)
- Nuevas descripciones de **lípidos volátiles** utilizados como señales por las plantas y de los pigmentos de las alas de aves derivados de lípidos coloreados en alimentos vegetales (Capítulo 10)
- Sección ampliada y puesta al día sobre **balsas lipídicas y caveolas** que incluye nuevo material sobre curvatura de la membrana y las proteínas que influyen en ello, e introducción de proteínas anfitrópicas y lípidos anulares (Capítulo 11)
- Nueva sección sobre el papel emergente de la **ribulosa 5-fosfato** como regulador central de la glucólisis y la gluconeogénesis (Capítulo 15)
- Nuevo Recuadro 16-1, Enzimas "claro de luna": **proteínas con más de una función**
- Nueva sección sobre el papel de los factores de transcripción **(PPAR)** en la regulación del catabolismo de lípidos (Capítulo 17)
- Sección revisada y puesta al día sobre la **ácido graso sintasa,** en la que se incluye nueva información estructural sobre FAS I (Capítulo 21)

- Tratamiento puesto al día del ciclo del nitrógeno en el que se incluye el Recuadro 22-1, Estilos de vida poco comunes de lo invisible pero abundante, en el que se discuten las **bacterias anamox** (Capítulo 22)
- Nuevo Recuadro 24-2, Epigenética, estructura nucleosómica y variantes de histona que describen el papel de la **modificación de histonas y deposición de nucleosomas** en la transmisión de información epigenética en la herencia.

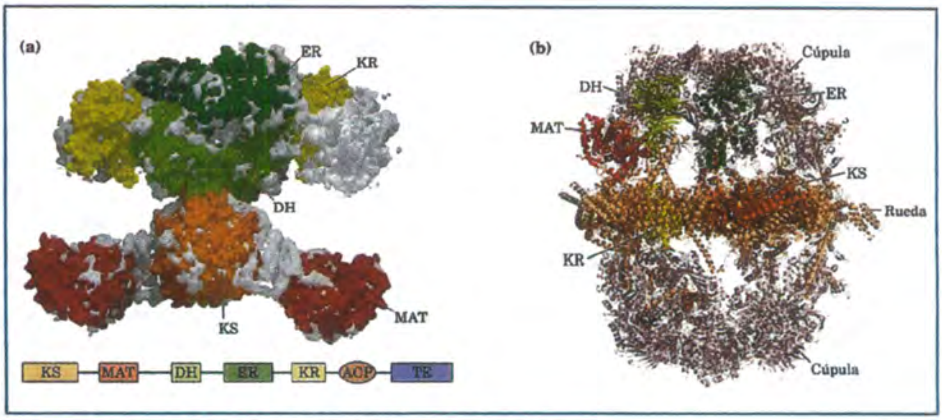


FIGURA 21–3 Estructura de los sistemas ácido graso sintasa de tipo I.

- Nueva información sobre el inicio de la replicación y la dinámica en la horquilla de replicación con introducción de **AAA+ ATPasas** y sus funciones en la replicación y otros aspectos del metabolismo del DNA (Capítulo 25)
- Nueva sección sobre el conocimiento ampliado de las **funciones del RNA** en las células (Capítulo 26)
- Nueva información sobre las **funciones del RNA en la biosíntesis de proteínas** (Capítulo 27)
- Nueva sección sobre **ribointerruptores** (Capítulo 28)
- Nuevo Recuadro 28-1, Aletas, alas, picos y otras estructuras, que describe las conexiones entre **evolución y desarrollo**

Métodos bioquímicos

Un juicio de la bioquímica requiere a menudo un conocimiento sobre cómo se obtiene la información bioquímica. Algunos de los métodos nuevos o puestos al día descritos en esta edición son:

- Dicroísmo circular (Capítulo 4)
- Medición de la hemoglobina glucada como indicador de la concentración promedio de glucosa sanguínea, en períodos de varios días, en personas con diabetes (Capítulo 7)
- La utilización de MALDI-MS en la determinación de la estructura de los oligosacáridos (Capítulo 7)
- Análisis forense del DNA, una importante puesta al día que cubre los modernos análisis de STR (Capítulo 9)
- Más sobre microchips (Capítulo 9)
- Utilización de marcas para el análisis y purificación de proteínas (Capítulo 9)
- PET combinada con barridos CT para identificar el cáncer (Capítulo 14)
- Inmunoprecipitación de la cromatina y experimentos ChIP-chip (Capítulo 24)

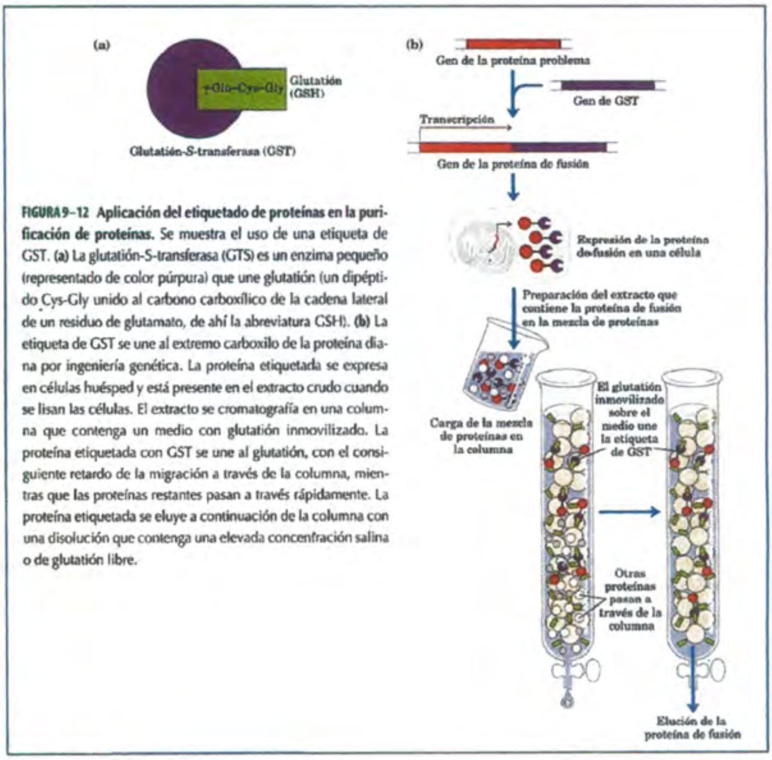


FIGURA 9–12 Aplicación del etiquetado de proteínas en la purificación de proteínas. Se muestra el uso de una etiqueta de GST. **(a)** La glutatión-S-transferasa (GTS) es un enzima pequeño (representado de color púrpura) que une glutatión (un dipéptido Cys-Gly unido al carbono carboxílico de la cadena lateral de un residuo de glutamato, de ahí la abreviatura GSH). **(b)** La etiqueta de GST se une al extremo carboxilo de la proteína diana por ingeniería genética. La proteína etiquetada se expresa en células huésped y está presente en el extracto crudo cuando se lisan las células. El extracto se cromatografía en una columna que contenga un medio con glutatión inmovilizado. La proteína etiquetada con GST se une al glutatión, con el consiguiente retardo de la migración a través de la columna, mientras que las proteínas restantes pasan a través rápidamente. La proteína etiquetada se eluye a continuación de la columna con una disolución que contenga una elevada concentración salina o de glutatión libre.

FIGURA 9–12

- Desarrollo de cepas bacterianas con códigos genéticos alterados, para la inserción específica de sitio de nuevos aminoácidos en proteínas (Capítulo 27)

Ejemplos de interés médico

Este icono se utiliza a lo largo de todo el libro para indicar material de interés médico especial. Como profesores, nuestro objetivo es que los estudiantes aprendan bioquímica y entiendan su importancia para una vida y un planeta más sanos. Hemos introducido muchos ejemplos nuevos que relacionan la bioquímica con la medicina y con los temas de salud en general. Algunas de las aplicaciones médicas nuevas de esta edición son:

- El papel de los ácidos grasos poiinsaturados y los ácidos grasos trans en las enfermedades cardiovasculares (Capítulo 10).
- Receptores acoplados a proteínas G (GCPR) y gama de enfermedades en las que se están desarrollando fármacos dirigidos a los GCPR (Capítulo 12)
- Proteínas G, regulación de la actividad GTPasa y consecuencias médicas de una función de proteína G defectuosa (Capítulo 12), con el nuevo Recuadro 12-2, Proteínas G: interruptores binarios en salud y enfermedad
- Recuadro 12-5, Desarrollo de inhibidores de la proteína quinasa para el tratamiento del cáncer
- Recuadro 14-1, La alta velocidad de la glucólisis en los tumores sugiere dianas para la quimioterapia y facilita el diagnóstico
- Recuadro 15-3, Mutaciones genéticas causantes de formas raras de diabetes
- Mutaciones en los enzimas del ciclo del ácido cítrico que provocan cáncer (Capítulo 16)
- La anemia perniciosa y problemas asociados en los vegetarianos estrictos (Capítulo 18)
- Puesta al día de la información sobre inhibidores de la ciclooxigenasa (analgésicos Vioxx, Celebrex, Bextra) (Capítulo 21)
- HMG-CoA reductasa (Capítulo 21) y Recuadro 21-3, La hipótesis lipídica y el desarrollo de las estatinas
- Recuadro 24-1, Curación de enfermedades por inhibición de topoisomerasas, en el que se describe el uso de inhibidores de la topoisomerasa en el tratamiento de infecciones bacterianas y el cáncer, entre los que se incluyen el ciprofloxacino (el antibiótico efectivo contra el ántrax)

Tema especial: conocimiento del metabolismo a través de la obesidad y la diabetes

La obesidad y sus consecuencias médicas, enfermedades cardiovasculares y diabetes, se está convirtiendo rápidamente en una epidemia, por lo que se incluye nuevo material sobre las conexiones bioquímicas entre obesidad y salud a lo largo de esta edición. Nuestro enfoque en la diabetes proporciona un tema integrador a lo largo de los capítulos sobre el metabolismo y su control lo que inspirará, esperamos, a algunos estudiantes a encontrar soluciones para esta enfermedad. Algunas de las secciones y recuadros que destacan la interrelación de metabolismo, obesidad y diabetes son:

- La diabetes no tratada produce acidosis que puede ser mortal (Capítulo 2)
- Recuadro 7-1, Determinación de la glucosa sanguínea en el diagnóstico y en el tratamiento de la diabetes, en donde se introduce la glucación de la hemoglobina y los AGE y su papel en la patología de la diabetes avanzada
- Recuadro 11-2, Transporte defectuoso de glucosa y de agua en dos formas de diabetes
- La captación de glucosa es deficiente en la diabetes mellitus tipo 1 (Capítulo 14)
- Los cuerpos cetónicos se producen en exceso en la diabetes y en la inanición (Capítulo 17)
- Algunas mutaciones del genoma mitocondrial son causa de enfermedades (Capítulo 19)
- La diabetes puede ser resultado de defectos en las mitocondrias de las células β del páncreas (Capítulo 19)

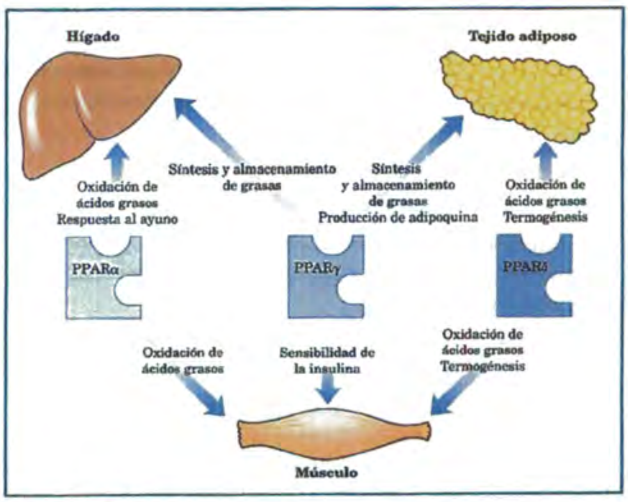


FIGURA 23–42

- El tejido adiposo genera glicerol 3-fosfato mediante gliceroneogénesis (Capítulo 21)
- La diabetes mellitus aparece por defectos en la producción o acción de la insulina (Capítulo 23)
- La Sección 23.4, Obesidad y regulación de la masa corporal, discute el papel de la adiponectina y la sensibilidad a la insulina y la diabetes de tipo 2
- En la Sección 23.5, Obesidad, síndrome metabólico y diabetes de tipo 2, se incluye una discusión sobre la diabetes de tipo 2 y el ejercicio, la dieta y la medicación

Avances en la enseñanza de la bioquímica

Revisar este libro de texto no es nunca un ejercicio solamente de puesta al día. Como mínimo se utiliza el mismo tiempo en reexaminar la forma en que se presentan los temas centrales de la bioquímica. Hemos revisado cada capítulo con la vista puesta en ayudar a los estudiantes a aprender y dominar los fundamentos de la bioquímica. Los estudiantes que entran por primera vez en contacto con la bioquímica a menudo tienen dificultades con dos aspectos clave del curso: enfrentarse con los problemas cuantitativos y utilizar lo que han aprendido en química orgánica para que les ayude a comprender la bioquímica. Esos mismos estudiantes también han de aprender un lenguaje complejo, con convenciones que a menudo pasan sin mencionarse explícitamente. Hemos introducido algunos cambios importantes en el libro para ayudar a los estudiantes a salir adelante con todos estos retos: nuevas herramientas para resolver problemas, un interés en los cimientos de química orgánica y destacar las convenciones clave.

Nuevas herramientas para resolver problemas

- **Nuevos ejemplos prácticos dentro del texto** ayudan a los estudiantes a mejorar sus capacidades de resolver problemas cuantitativos, llevándolos a través de las ecuaciones más difíciles.
- **Más de 100 nuevos problemas de final de capítulo** dan a los estudiantes más oportunidades de practicar lo que han aprendido.
- **Nuevos problemas de análisis de datos** (uno al final de cada capítulo) preparados por Brian White de la Universidad de Massachussetts-Boston, animan a los estudiantes a sintetizar lo que han aprendido y a aplicar su conocimiento a la interpretación de datos de la bibliografía.

EJEMPLO PRÁCTICO 11–3 Energía del bombeo por un contransportador paralelo

Calcule la razón máxima $\frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}}$ que puede obtener el transportador paralelo de Na^+-glucosa de la membrana plasmática de una célula epitelial cuando la $[Na^+]_{in}$ intracelular es de 12 mM, la $[Na^+]_{out}$ extracelular de 145 mm, el potencial de membrana es de −50 mV (negativo en el interior) y la temperatura es de 37 °C.

Solución: Utilizando la ecuación 11–4 (p. 396), podemos calcular la energía inherente en un gradiente electroquímico de Na^+, es decir, el coste que supone transportar un ión Na^+ contra este gradiente:

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[\text{Na}]_{out}}{[\text{Na}]_{in}} + Z\mathcal{J}\,\Delta\psi$$

Sustituimos a continuación los valores estándar de R, T y $\mathcal{J}$, y los valores dados para $[Na^+]$ (expresados en concentraciones molares), +1 para Z (porque Na^+ tiene una carga positiva) y 0,050 V para $\Delta\psi$. Observe que el potencial de membrana es −50 mV (negativo en el interior), por lo que la variación de potencial cuando un ión se traslada desde el interior al exterior es de 50 mV.

$$\Delta G_t = (8{,}315\ \text{J/mol}\cdot\text{K})(310\ \text{K}) \ln \frac{1{,}45 \times 10^{-1}}{1{,}2 \times 10^{-2}} + 1(96.500\ \text{J/V}\cdot\text{mol})(0{,}050\ \text{V}) = 11{,}2\ \text{kJ/mol}$$

Esta ΔG_t es la energía potencial por mol de Na^+ en el gradiente de Na^+ que está disponible para bombear glucosa. Dado que pasan dos iones Na^+ a favor de su gradiente electroquímico al interior de la célula por cada molécula de glucosa transportada en el simport, la energía disponible para bombear 1 mol de glucosa es de 2 × 11,2 kJ/mol = 22,4 kJ/mol. Podemos calcular ahora la razón de concentración de glucosa que puede conseguirse con esta bomba (de la ecuación 11–3, p. 396):

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}}$$

Reordenando y sustituyendo los valores de ΔG_t, R y T, nos da

$$\ln \frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}} = \frac{\Delta G_t}{RT} = \frac{22{,}4\ \text{kJ/mol}}{(8{,}315\ \text{J/mol}\cdot\text{K})(310\ \text{K})} = 8{,}69$$

$$\frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}} = e^{8{,}69} = 5{,}94 \times 10^3$$

EJEMPLO PRÁCTICO 11–3

Interés en los cimientos de la química orgánica

- La nueva Sección 13.2, **Lógica química y reacciones bioquímicas comunes,** discute los tipos de reacciones bioquímicas comunes que constituyen la base de todas las reacciones metabólicas.
- La **lógica química** se refuerza en la discusión de las rutas metabólicas centrales.
- Las **figuras de mecanismo** constituyen descripciones paso a paso que ayudan a los estudiantes a comprender los procesos de reacción.
- En la presentación de los **mecanismos de reacción** utilizamos de manera consistente un conjunto de convenciones introducido y explicado en detalle en el primer mecanismo enzimático encontrado (quimotripsina, pp. 208-209). Algunos de los **problemas** nuevos se centran en los mecanismos químicos y refuerzan los temas mecanísticos.

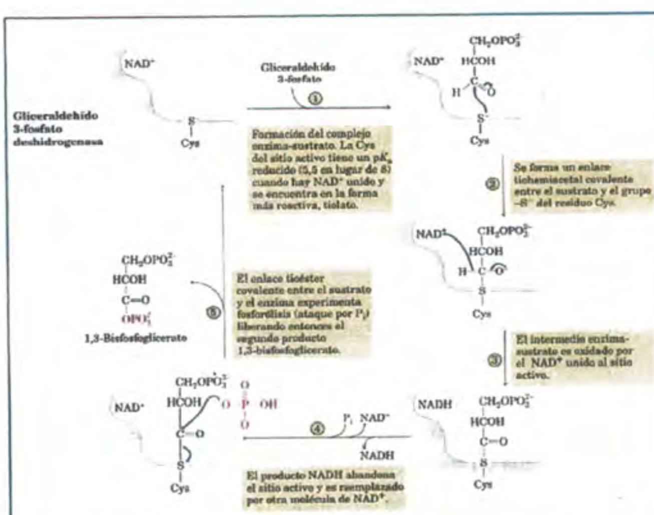


FIGURA 14–7

Convenciones clave

En esta edición, muchas de las convenciones que son tan necesarias para comprender cada tema bioquímico así como la literatura bioquímica se separan del texto resaltándolas. Estas **convenciones clave** incluyen expresiones claras de muchas presunciones y convenciones que se espera a menudo que los estudiantes asimilen sin que se las hayan mencionado (por ejemplo, las secuencias peptídicas se escriben desde el extremo amino-terminal al carboxilo-terminal de izquierda a derecha; las secuencias de nucleótidos se escriben desde el extremo 5′ al 3′, de izquierda a derecha).

CONVENCIÓN CLAVE: Cuando se escribe la secuencia de un péptido, polipéptido o proteína, el extremo amino se coloca a la izquierda y el extremo carboxilo a la derecha. La secuencia se lee de izquierda a derecha empezando por el residuo amino-terminal. ■

Internet y suplementos

Un conjunto completo de recursos informáticos y suplementos permiten que los instructores y estudiantes dispongan de herramientas innovadoras para apoyar diversos enfoques de enseñanza y de aprendizaje. Todos estos suplementos, que se describen a continuación, están en inglés y pueden solicitarse directamente a la editorial W.H. Freeman and Company, 41 Madison Avenue, New York, NY 10010, Estados Unidos, email: international@bfwpub.com, o a través de Los Andes Libros, S.L., Loreto 13-15, local C, 08029 Barcelona, teléfono 93 419 33 36, fax 93 419 51 89, email: libros@andeslibros.com.

eBook

Esta versión online del libro de texto combina el contenido del libro impreso, herramientas de estudio electrónicas y un completo complemento de medios para el estudiante en internet creados para dar soporte al texto. También proporciona material útil para los enseñantes.

- **eBook study tools** incluye navegación instantánea a cualquier sección o página del libro, elementos destacados, búsqueda instantánea de cualquier término, definiciones de términos clave plegables y un glosario hablado.
- El **student media** específico del texto, totalmente integrado a través del eBook, incluye mecanismos enzimáticos animados, técnicas bioquímicas animadas, vídeos de solución de problemas, tutorías de estructuras moleculares en Jmol, los ID del Protein Data Bank en Jmol, gráficos animados y adivinanzas online.
- Las **instructor features** incluyen la posibilidad de añadir notas o archivos a cualquier página y compartir estas notas. Las notas pueden contener texto, links de la red, animaciones o fotos. Los enseñantes pueden asignar el texto completo o una versión apropiada del eBook.

Medios adicionales para los docentes

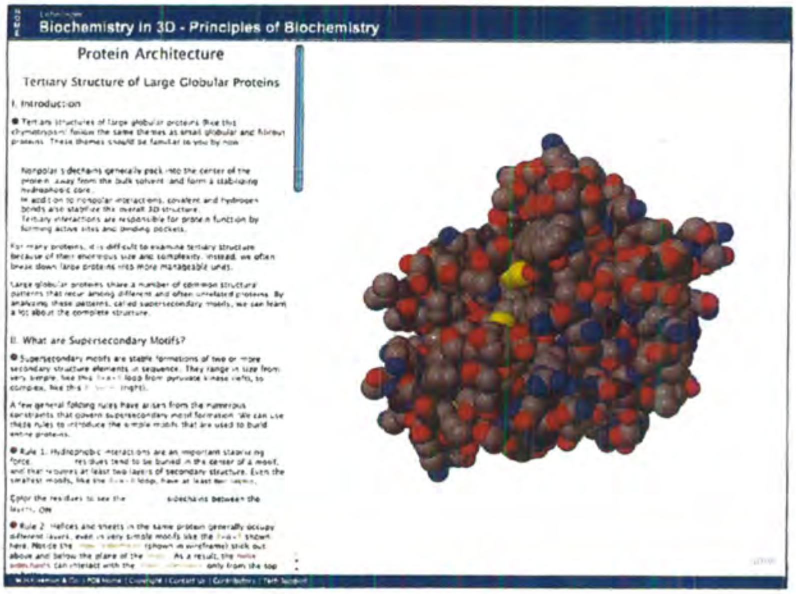
Los **docentes** disponen de un conjunto completo de herramientas para la docencia, todas desarrolladas para apoyar el texto, presentación de conferencias y estilos de docencia individuales. Todos los medios para los docentes se pueden descargar en el **sitio web** (www.whfreeman.com/lehninger5e) y en el **Instructor Resource CD/DVD** (ISBN 1-4292-1912-2). Estos medios informáticos incluyen:

- Archivos **JPEG completamente optimizados** de cada figura, foto y tabla en el texto. Se han revisado los archivos por docentes y comprobado en salas de conferencias grandes para asegurar la máxima claridad y visibilidad. Los JPEG también se ofrecen en archivos separados y en formato **PowerPoint®** para cada capítulo.
- Las 150 imágenes más interesantes del libro de texto están disponibles en un **Conjunto de transparencias** (ISBN 1-4292-1911-4), totalmente optimizadas para visibilidad máxima en la sala de conferencias.
- **Mecanismos enzimáticos animados** y **técnicas bioquímicas animadas** en archivos Flash y precargados en PowerPoint, tanto en formato PC como Macintosh para presentación de clases magistrales. (Véase la lista de temas de animación en la guarda anterior del libro.)
- Hay una lista de **ID del Protein Data Bank** para las estructuras del texto, ordenada según el número de figura. En esta edición se incluye un índice de todas las estruturas en el Web browser applet interactivo con Jmol.
- Los **gráficos animados** ilustran ecuaciones clave del libro de texto que muestran los resultados gráficos al cambiar los parámetros.
- Un **Test Bank** completo en formatos PDF y Word editable incluye 150 problemas de elección múltiple o de respuesta corta por capítulo, ordenados según dificultad.

Medios informáticos adicionales para el estudiante

Los **estudiantes** disponen de medios diseñados para favorecer la comprensión de los principios bioquímicos y mejorar su capacidad de resolución de problemas. Todos los medios para los estudiantes, junto con las **estructuras PDB** y los **gráficos animados,** también están en el **eBook** y muchos se encuentran en el sitio web del libro (www.whfreeman.com/lehninger5e). Los medios informáticos para el estudiante comprenden:

- **Nuevos vídeos para la resolución de problemas,** creados por Scott Ensign de la Utah State University, que propocionan 24/7 ayudas online para la resolución de problemas por los estudiantes. Mediante una aproximación en dos partes, cada vídeo de 10 minutos cubre un problema clave del libro de texto que representa un tema por el cual los estudiantes han de esforzarse para dominar. Ensign describe primero una estrategia comprobada para la resolución de problemas y a continuación aplica dicha estrategia al problema elegido mediante pasos claros y concisos. Los estudiantes pueden parar, rebobinar y revisar cualquier paso a su antojo hasta que dominan firmemente, no sólo la solución sino también el razonamiento que lo soporta. El tratamiento de los problemas de esta forma está diseñado para que los estudiantes mejoren y tengan más confianza en la aplicación de estrategias clave en el momento de resolver otros problemas del libro de texto o de los exámenes.
- Versiones para los estudiantes de los **mecanismos enzimáticos animados** y **técnicas bioquímicas animadas** que los ayudan en su comprensión de mecanismos y técnicas clave a su propio ritmo. Para una lista de temas de animación véase la guarda anterior del libro.



- Los **Molecular Structure Tutorials,** que utilizan el Jmol-Web browser applet, permiten que los estudiantes exploren más profundamente las estructuras moleculares que se encuentran en libro de texto, entre ellas:
  - Arquitectura de proteínas
  - Bacteriorrodopsina
  - Represor Lac
  - Nucleótidos
  - Moléculas MHC
  - Proteínas G triméricas
  - Proteínas de unión de oxígeno
  - Endonucleasas de restricción
  - Ribozima en cabeza de martillo
- **Las adivinanzas online** incluyen unas 20 preguntas de elección múltiple interesantes de cada capítulo, con una graduación automática y con referencias al texto y con una retroalimentación en todas las respuestas.

The Absolute, Ultimate Guide to Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition, Study Guide and Solutions Manual, por Marcy Osgood (University of New Mexico School of Medicine) y Karen Ocorr (University of California, San Diego); 1-4292-1241-1

The Absolute, Ultimate Guide combina una guía de estudio innovadora con un manual seguro de soluciones (con soluciones detalladas para todos los problemas de final de capítulo) en un volumen único y manejable. Probado a fondo en clases, incluye en cada capítulo:

- **Conceptos principales:** un mapa de comunicaciones a lo largo del capítulo
- **Qué se ha de revisar:** preguntas que recapitulan puntos clave de capítulos anteriores
- **Cuestiones a discutir:** proporcionadas para cada sección; diseñadas para revisión individual, grupos de estudio o discusiones en el aula
- **Un auto-test:** "¿Conoce los términos?"; crucigramas; preguntas de elección múltiple; cuestiones promovidas por hechos y preguntas que obligan a los estudiantes a aplicar sus nuevos conocimientos en nuevas direcciones (¡más las soluciones!)

Agradecimientos

Este libro representa el esfuerzo de un equipo y hubiese sido imposible producirlo sin el excelente personal de W. H. Freeman and Company que nos apoyaron en todos los pasos recorridos. Randi Rossignol (director senior) y Kate Ahr (director ejecutivo) organizaron revisiones, hicieron múltiples sugerencias, nos animaron, nos mantuvieron en los objetivos e intentaron con valentía (aunque no siempre con éxito) que respetásemos los plazos. Nuestra excepcional directora del proyecto, Liz Geller, consiguió en cierta manera que el libro siguiese su camino a través de la producción a pesar de nuestros incumplimientos con los plazos y los cambios de última hora, cosa que hizo con su habitual gracia y habilidad. Volvimos a tener la buena fortuna de trabajar con Linda Strange, una fantástica editora que ha realizado este trabajo en la cinco ediciones de los *Principios de bioquímica* (así como en las dos ediciones de su predecesor, *Bioquímica* de Lehninger). Sus aportaciones son valiosísimas y mejoran el texto en el que ella interviene. También volvimos a tener suerte con las aportaciones y aclaraciones de Morgan Ryan, que ya trabajó con nosotros en la tercera y cuarta ediciones. Agradecemos a la investigadora de fotografía Dena Digilio Betz por su ayuda en la localización de imágenes y a Nick Timoczko y Whitney Clench por conseguir que los textos y archivos fluyesen correctamente entre todos los participantes en el proyecto. También nuestro especial agradecimiento a Debbie Clare, directora asociada de marketing, por su creatividad y buen humor en la coordinación del esfuerzo comercial y de marketing.

En Madison, Brook Soltvedt es (y ha sido en todas las ediciones en las que hemos trabajado) nuestra crítica y editora de primera línea. Es la primera que ve los capítulos manuscritos, ayuda en el desarrollo del manuscrito y de las figuras, asegura la cohesión interna tanto en el contexto como en la nomenclatura y nos mantiene en el trabajo con presiones más o menos gentiles. Al igual que lo hizo con la cuarta edición, Shelley Lusetti, actualmente en la New Mexico State University, leyó cada una de las palabras del texto en las galeradas, captó numerosos errores y aportó muchas sugerencias que mejoraron el texto.

Las nuevas imágenes en esta edición, incluidos los nuevos gráficos moleculares, fueron obra de Adam Steinberg, aquí en Madison, quien, a menudo hizo propuestas valiosas que se plasmaron en ilustraciones mejores y más claras. Esta edición también contiene muchos gráficos moleculares producidos para la tercera y cuarta ediciones por Jean-Yves Sgro, otro co-

lega de Madison. Nos consideramos muy afortunados al tener unos compañeros de equipo tan valiosos como Brook, Shelley, Adam y Jean-Yves.

También estamos muy agradecidos a Brian White de la Universidad de Massachusetts-Boston, que escribió los nuevos problemas de análisis de datos al final de cada capítulo.

Muchos colegas jugaron un papel especial gracias a su interés en el proyecto y a su aportación oportuna. Entre ellos son de destacar Laurens Anderson, de la Universidad de Wisconsin-Madison; Jeffrey D. Esko, de la Universidad de California, San Diego; Jack Kirsch y sus estudiantes, de la Universidad de California, Berkeley, y Dana Aswad, Shiou Chuan (Sheryl) Tsai, Michael G. Cumsky y colaboradores (mencionados más adelante), de la Universidad de California, Irvine. Muchas personas más nos ayudaron a dar forma a esta quinta edición con sus comentarios, sugerencias y críticas. A todos ellos nuestro más profundo agradecimiento:

Richard M. Amasino, *University of Wisconsin–Madison*
Louise E. Anderson, *University of Illinois at Chicago*
Cheryl Bailey, *University of Nebraska, Lincoln*
Kenneth Balazovich, *University of Michigan*
Thomas O. Baldwin, *University of Arizona*
Vahe Bandarian, *University of Arizona*
Eugene Barber, *University of Rochester*
Sebastian Y. Bednarek, *University of Wisconsin–Madison*
Ramachandra Bhat, *Lincoln University*
James Blankenship, *Cornell University*
Sandra J. Bonetti, *Colorado State University, Pueblo*
Barbara Bowman, *University of California, Berkeley*
Scott D. Briggs, *Purdue University*
Jeff Brodsky, *University of Pittsburgh*
Ben Caldwell, *Missouri Western State University*
David Camerini, *University of California, Irvine*
Guillaume Chanfreau, *University of California, Los Angeles*
Melanie Cocco, *University of California, Irvine*
Jeffrey Cohlberg, *California State University, Long Beach*
Kim D. Collins, *University of Maryland*
Charles T. Dameron, *Duquesne University*
Richard S. Eisenstein, *University of Wisconsin–Madison*
Gerald W. Feigenson, *Cornell University*
Robert H. Fillingame, *University of Wisconsin–Madison*
Brian Fox, *University of Wisconsin–Madison*
Gerald D. Frenkel, *Rutgers University*
Perry Frey, *University of Wisconsin–Madison*
David E. Graham, *University of Texas-Austin*
William J. Grimes, *University of Arizona*
Martyn Gunn, *Texas A&M University*
Olivia Hanson, *University of Central Oklahoma*
Amy Hark, *Muhlenberg College*
Shaun V. Hernandez, *University of Wisconsin–Madison*
Peter Hinkle, *Cornell University*
P. Shing Ho, *Oregon State University*
Charles G. Hoogstraten, *Michigan State University*
Gerwald Jogl, *Brown University*
Sir Hans Kornberg, *Boston University*
Bob Landick, *University of Wisconsin–Madison*
Patrick D. Larkin, *Texas A&M University, Corpus Christi*
Ryan P. Liegel, *University of Wisconsin–Madison*
Maria Linder, *California State University, Fullerton*
Andy C. LiWang, *Texas A&M University*
John Makemson, *Florida International University*
John C. Matthews, *University of Mississippi, School of Pharmacy*
Benjamin J. McFarland, *Seattle Pacific University*
Anant Menon, *Weill Cornell Medical College*
Sabeeha Merchant, *University of California, Los Angeles*
Scott C. Mohr, *Boston University*
Kimberly Mowry, *Brown University*
Leisha Mullins, *Texas A&M University*
Sewite Negash, *California State University, Long Beach*
Allen W. Nicholson, *Temple University*
Hiroshi Nikaido, *University of California, Berkeley*
James Ntambi, *University of Wisconsin–Madison*
Timothy F. Osborne, *University of California, Irvine*
José R. Pérez-Castiñeira, *University of Seville, Spain*
Terry Platt, *University of Rochester*
Wendy Pogozelski, *State University of New York at Geneseo*
Jonathan Popper, *University of Wisconsin–Madison*
Thomas Poulos, *University of California, Irvine*
Jack Preiss, *Michigan State University*
Anna Radominska-Pandya, *University of Arkansas*
Ron Raines, *University of Wisconsin–Madison*
Tom A. Rapoport, *Harvard Medical School*
Jason J. Reddick, *University of North Carolina, Greensboro*
Mary Roberts, *Boston College*
Ingrid K. Ruf, *University of California, Irvine*
Aboozar Soleimani, *Tehran University, Iran*
Mark Spaller, *Wayne State University*
Stephen Spiro, *University of Texas at Dallas*
Narasimha Sreerama, *Colorado State University*
Jon D. Stewart, *University of Florida*
Koni Stone, *California State University, Stanislaus*
Jon R. Stultzfus, *Michigan State University*
Jeremy Thorner, *University of California, Berkeley*
Dean R. Tolan, *Boston University*
Sandra L. Turchi, *Millersville University*
Manuel Varela, *Eastern New Mexico University*
Bob Warburton, *Shepherd University*
Tracy Ware, *Salem State College*
Susan Weintraub, *University of Texas, Health Science Center*
Michael Yaffe, *Massachusetts Institute of Technology*

Nos falta espacio para agradecer a todas las personas cuyos esfuerzos especiales fueron a parar a este libro. En su lugar ofrecemos nuestras sinceras gracias y el libro acabado que ayudaron a que fuese una realidad. Nosotros, por supuesto, asumimos toda la responsabilidad por los errores de hecho o de énfasis.

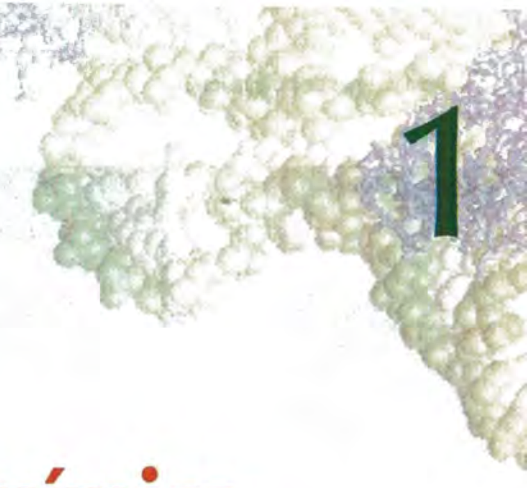
Estamos agradecidos a nuestros estudiantes de la Universidad de Wisconsin-Madison que proporcionaron inspiración y numerosas ideas para su mejora. Si hay algo en el libro que no es correcto, nunca se han avergonzado de decírnoslo. Agradecemos a los estudiantes y personal de nuestros equipos de investigación y al Center for Biology Education que nos ayudaron a mantener en equilibrio los retos de nuestro tiempo; a nuestros colegas del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Wisconsin-Madison que nos ayudaron con sus consejos y críticas y a todos los estudiantes y profesores que nos han sugerido cómo podemos mejorar nuestro libro. Esperamos que nuestros lectores continuarán proporcionándonos ideas para futuras ediciones.

Finalmente, expresamos nuestro más profundo reconocimiento a nuestras esposas, Brook y Beth, y a nuestras familias, que mostraron una paciencia extraordinaria, así como un apoyo constante, a la redacción de este libro.

David L. Nelson
Michael M. Cox
Madison, Wisconsin

Índice general

Índice de materias



1

> Con la célula, la biología descubrió su átomo... A partir de entonces el estudio de la célula y la caracterización de su estructura fueron ya esenciales para identificar aquellas propiedades comunes y necesarias para la vida de todas las células y, complementariamente, para identificar las diferencias asociadas con funciones específicas.
>
> —*François Jacob,* La logique du vivant: une histoire de l'hérédité (La lógica de la vida: una historia de la herencia), 1970

Fundamentos de bioquímica

Hace aproximadamente unos quince mil millones de años, el universo nació de un cataclismo explosivo que esparció partículas subátomicas extremadamente calientes y ricas en energía. En cuestión de segundos se formaron los elementos más simples (el hidrógeno y el helio). Al tiempo que el universo se expandía y enfriaba, se condensaba la materia bajo la influencia de la gravedad y se formaban las estrellas. Algunas de ellas se hicieron enormes y, a continuación, explotaron en forma de supernovas y liberaron la energía necesaria para producir elementos más complejos a partir de la fusión de los núcleos atómicos más simples. De este modo aparecieron, a lo largo de miles de millones de años, la Tierra y los elementos químicos que hoy se encuentran en ella. La vida apareció hace unos cuatro mil millones de años en forma de microorganismos sencillos dotados de la capacidad de extraer energía de los compuestos químicos y después de la luz solar. Esta energía sirvió para sintetizar una amplia variedad de **biomoléculas** más complejas a partir de los elementos y compuestos más simples presentes en la superficie de la Tierra.

La bioquímica se pregunta acerca del modo en que miles de diferentes moléculas inanimadas dieron lugar a las complejas propiedades de los organismos vivos. Cuando estas moléculas se aíslan y examinan individualmente cumplen todas las leyes físicas y químicas que describen el comportamiento de la materia inanimada, del mismo modo que ocurre con todos los procesos que tienen lugar en organismos vivos. El estudio de la bioquímica muestra el modo en que las colecciones de moléculas inanimadas que constituyen los organismos vivos interaccionan para mantener y perpetuar la vida, rigiéndose únicamente por las mismas leyes físicas y químicas que gobiernan todo el universo.

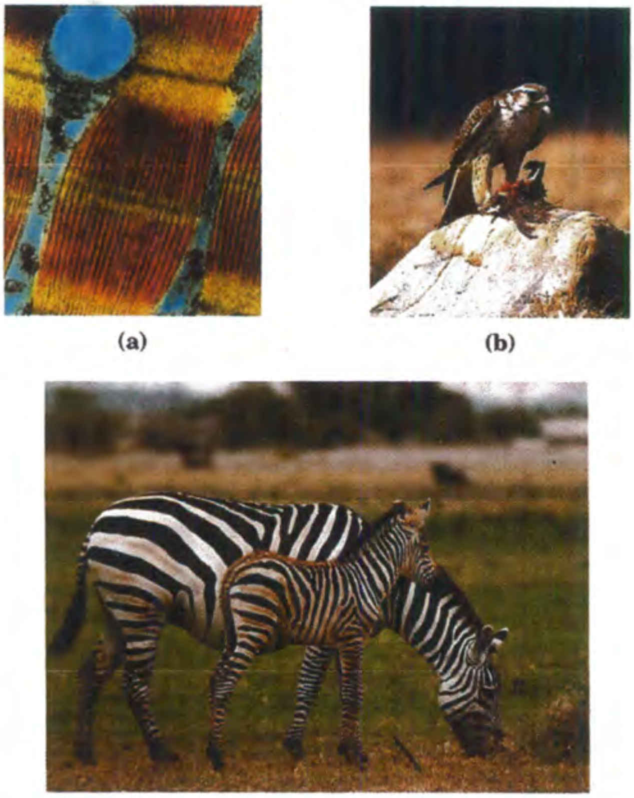
A pesar de ello, los organismos poseen cualidades extraordinarias, que los distinguen de otras agrupaciones de materia. ¿Cuáles son, pues, las características distintivas de los organismos vivos?

Un elevado grado de complejidad química y de organización microscópica. Las intrincadas estructuras internas celulares están formadas por miles de moléculas diferentes (**Fig. 1–1a**). Entre ellas se cuentan polímeros muy largos, cada uno de ellos con su propia secuencia de subunidades, su estructura tridimensional única y su capacidad para interaccionar de forma específica y selectiva con otras moléculas celulares.

La existencia de sistemas para la extracción, transformación y uso de energía del entorno (Fig. 1–1b), que permite a los organismos construir y mantener sus complejas estructuras y llevar a cabo un trabajo mecánico, químico, osmótico y eléctrico. Ello se opone a la tendencia que toda materia tiene a degradarse hacia un estado más desordenado y a quedar finalmente en equilibrio con su entorno.

La existencia de funciones definidas para cada uno de los componentes de un organismo y la regulación de las interacciones entre ellos. Esto es cierto no únicamente para estructuras macroscópicas tales como hojas y tallos o corazón y pulmones, sino también para estructuras microscópicas intracelulares y para compuestos químicos individuales. Existe una relación dinámica entre los componentes químicos de un organismo vivo; los cambios en uno de los componentes producen cambios coordinados o compensatorios en otro, de modo que el conjunto posee un carácter propio, más allá del de cada una de sus partes individuales. El conjunto de moléculas lleva a cabo un programa que tiene como resultado final la reproducción del mismo y la autoperpetuación de este conjunto de moléculas; en definitiva, el resultado final es la vida.

Mecanismos para detectar y responder a las alteraciones en su entorno, mediante un ajuste constante a estos cambios gracias a la adaptación de sus procesos químicos internos a su posición en el ambiente que los rodea.



(a) (b) (c)

FIGURA 1–1 Algunas características de la materia viva. **(a)** En esta sección fina de tejido muscular de vertebrado, vista al microscopio electrónico, se aprecia su organización y complejidad microscópica. **(b)** Un halcón de las praderas se nutre mediante el consumo de un pequeño pájaro. **(c)** La reproducción biológica tiene lugar con fidelidad casi perfecta.

La capacidad de autorreplicarse y autoensamblarse (Fig. 1–1c). Una única célula bacteriana colocada en un medio nutriente estéril puede generar miles de millones de células "hijas" idénticas a ella en 24 horas. Cada célula contiene miles de moléculas diferentes, algunas de ellas de una gran complejidad; a pesar de ello, cada bacteria es una copia fiel del original y toda la información para su construcción está contenida en el material genético de la célula original.

La capacidad de cambiar a lo largo del tiempo mediante evolución gradual. Los organismos varían sus estrategias vitales heredadas en pasos muy pequeños, para sobrevivir en situaciones nuevas. El resultado de eones de años de evolución es una enorme diversidad de formas de vida, superficialmente muy diferentes **(Fig. 1–2)** pero relacionadas en lo fundamental a través de sus ancestros comunes. Esta unidad fundamental de los organismos vivos se refleja a nivel molecular en la similitud de secuencias génicas y de estructuras de proteínas.

A pesar de la existencia de estas propiedades comunes de las que se deduce que existe una uniformidad fundamental en todas las manifestaciones de la vida, resulta difícil hacer generalizaciones sobre los organismos. La diversidad de organismos en la Tierra es enorme. La gama de hábitats, desde aguas termales hasta la tundra ártica, desde el intestino animal hasta los dormitorios de colegios mayores, tiene su reflejo en la gama igualmente amplia de adaptaciones bioquímicas específicas que tienen lugar en un entorno químico compartido. Con el objeto de primar la claridad de exposición, en este libro nos arriesgaremos a algunas generalizaciones que, aunque no perfectas, resultan útiles; con frecuencia también comentaremos algunas excepciones que pueden ayudar a aclarar las generalizaciones.

La bioquímica describe en términos moleculares aquellas estructuras, mecanismos y procesos químicos compartidos por todos los organismos y proporciona los principios de organización que subyacen en todas las diversas formas de vida, principios a los que nos referiremos colectivamente como la *lógica molecular de la vida*. Aunque la bioquímica proporciona conocimientos y aplicaciones prácticas que son importantes en medicina, agricultura, nutrición e industria, su preocupación última es el prodigio de la vida misma.

Por lo tanto, en este capítulo introductorio describiremos brevemente los fundamentos celulares, químicos, físicos y genéticos de la bioquímica y el principio general de la evolución: el desarrollo de las propiedades de las células vivas a lo largo de las generaciones. Durante la lectura de este libro puede resultar útil referirse a este capítulo de vez en cuando con el objeto de refrescar la memoria sobre estos temas básicos.

1.1 Fundamentos celulares

La unidad y diversidad de los organismos es evidente incluso a nivel celular. Los organismos más pequeños son unicelulares y microscópicos. Los organismos mayores, multicelulares, contienen muchos tipos de células de tamaño, forma y funciones diferentes. A pesar de estas diferencias obvias, todas las células,

FIGURA 1–2 Diferentes organismos vivos comparten características químicas comunes. Pájaros, bestias, plantas y microorganismos del suelo comparten las mismas unidades estructurales básicas (células) y los mismos tipos de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas) compuestas por los mismos tipos de subunidades monoméricas (nucleótidos, aminoácidos). Utilizan las mismas rutas de síntesis de los componentes celulares, comparten el mismo código genético y descienden de los mismos ancestros evolutivos. Detalle del "Jardín del Edén", obra de Jan van Kessel, el joven (1626-1679).

desde las de los más simples a las de los más complejos organismos, comparten ciertas propiedades fundamentales, observables a nivel bioquímico.

Las células son las unidades estructurales y funcionales de todos los organismos vivos

Todas las células comparten ciertas características estructurales **(Fig. 1-3)**. La **membrana plasmática** define la periferia de la célula, separando su contenido del medio externo. Está compuesta por moléculas de lípidos y de proteínas que forman una barrera hidrofóbica fina, dura y flexible alrededor de la célula. La membrana actúa como una barrera a la libre circulación de iones inorgánicos y de la mayor parte de compuestos cargados o polares. Las proteínas de transporte de la membrana plasmática permiten el paso de ciertos iones y moléculas; las proteínas receptoras transmiten señales hacia el interior de la célula; por su parte, los enzimas de membrana participan en algunas reacciones. Gracias a la interacción no covalente entre las subunidades individuales de lípidos y proteínas de la membrana plasmática, la estructura global tiene un elevado grado de flexibilidad que permite que se produzcan cambios en la forma y el tamaño de la célula. Al crecer la célula se insertan en la membrana plasmática nuevas moléculas de lípido y proteína recién sintetizadas; la división celular produce dos células, cada una de las cuales posee su propia membrana. El crecimiento y la división (fisión) celulares se producen sin pérdida de la integridad de la membrana.

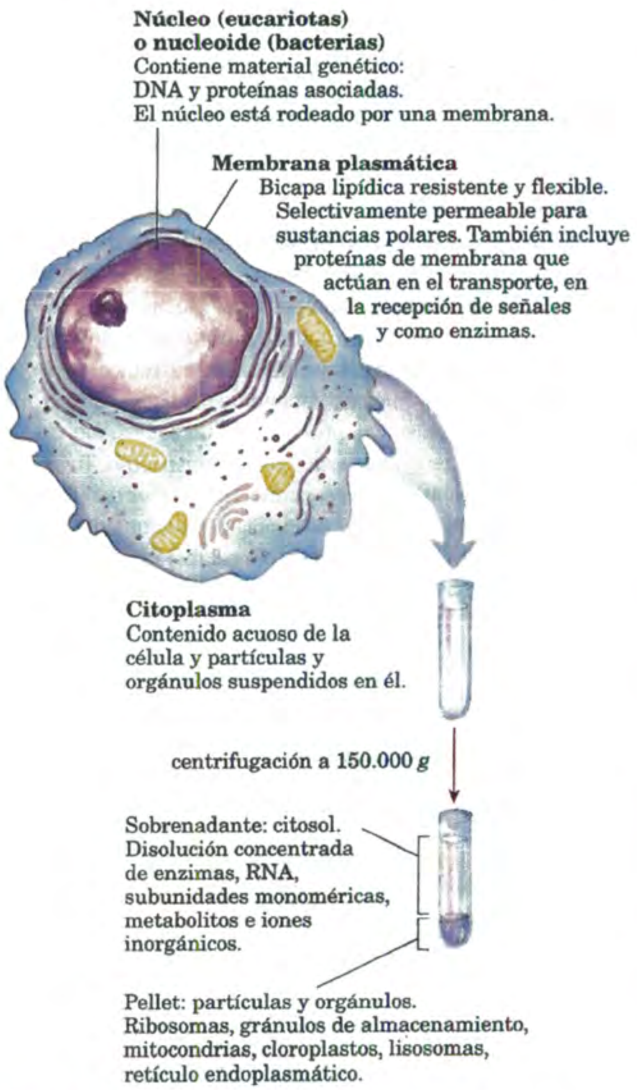


FIGURA 1-3 Características universales de todas las células vivas. Todas las células tienen núcleo o nucleoide, una membrana plasmática y citoplasma. El citosol es la parte del citoplasma que permanece en el sobrenadante después de la rotura suave de la membrana plasmática y la centrifugación del extracto celular a 150.000 *g* durante 1 hora.

El volumen interno limitado por la membrana celular, el **citoplasma** (Fig. 1-3), está compuesto por una disolución acuosa, el **citosol,** y una variedad de partículas en suspensión con funciones específicas. El citosol es una disolución muy concentrada que contiene enzimas y las moléculas de RNA que los codifican; los componentes (aminoácidos y nucleótidos) a partir de los cuales se forman estas macromoléculas; centenares de pequeñas moléculas orgánicas denominadas **metabolitos,** intermediarios de las rutas biosintéticas y degradativas; **coenzimas,** compuestos esenciales en muchas reacciones catalizadas enzimáticamente; iones inorgánicos y estructuras macromoleculares tales como los **ribosomas,** en los que tiene lugar la síntesis de proteínas, y los **proteasomas,** que degradan proteínas que ya no son necesarias para la célula.

Todas las células tienen, al menos durante una parte de su ciclo vital, un **núcleo** o un **nucleoide,** en el que se almacena y replica el **genoma** (el conjunto de genes, compuestos de DNA). El nucleoide en bacterias y arqueas no se encuentra separado del citoplasma por una membrana, pero en los **eucariotas** el núcleo contiene el material nuclear que se halla englobado en el interior de una membrana doble, la envoltura nuclear. Las células con envoltura nuclear constituyen el amplio grupo Eukarya (del griego *eu*, "verdadero", y *karyon*, "núcleo"). Entre los microorganismos sin envoltura nuclear, antes denominados **procariotas** (del griego *pro*, "antes"), se distinguen ahora dos grupos, Bacteria y Archaea, que se describen más adelante.

Las dimensiones celulares están limitadas por la difusión

La mayor parte de células son de tamaño microscópico, invisibles al ojo humano. El diámetro típico de las células animales y vegetales es de unos 5 a 100 μm, y muchos organismos unicelulares tienen una longitud de tan sólo 1 a 2 μm (véase el envés de la cubierta posterior para encontrar información sobre las unidades y sus abreviaturas). ¿Qué es lo que limita las dimensiones de una célula? El límite inferior viene probablemente marcado por el número mínimo de cada una de las diferentes biomoléculas necesarias. Las células más pequeñas, ciertas bacterias conocidas como micoplasmas, tienen un diámetro de 300 nm y un volumen de aproximadamente 10^{-14} mL. Un solo ribosoma bacteriano tiene aproximadamente unos 20 nm en su dimensión más alargada, de modo que un pequeño número de ribosomas ocupan ya una fracción significativa del volumen de una célula de micoplasma.

El límite superior del tamaño celular viene marcado probablemente por la velocidad de difusión de las moléculas disueltas en sistemas acuosos. Así, una célula bacteriana que depende de reacciones que consumen oxígeno para la producción de su energía debe obtener el oxígeno molecular del medio en el que se halla mediante difusión a través de su membrana plasmática. La célula es tan pequeña y la relación entre el área de su superficie y su volumen tan grande, que el O_2 alcanza todas las partes

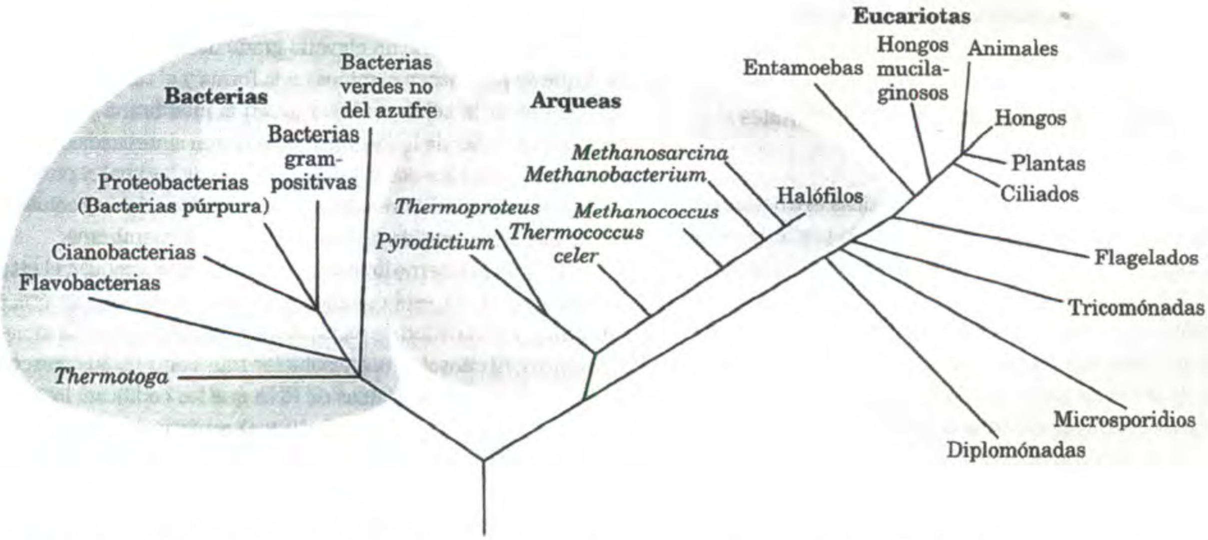


FIGURA 1–4 **Filogenia de los tres dominios de la vida.** Las relaciones filogenéticas se ilustran a menudo mediante un "árbol genealógico" de este tipo. Este árbol se basa en la similitud de las secuencias nucleotídicas de los RNA ribosómicos de cada uno de los grupos; a mayor similitud de secuencias, más cercanas estarán las ramas, con lo que la distancia entre ramas representa el grado de diferencia entre dos secuencias. También se pueden construir árboles filogenéticos a partir de similitudes entre las secuencias de aminoácidos de la misma proteína en especies diferentes. Por ejemplo, la comparación de las secuencias de la proteína GroEL (una proteína bacteriana que ayuda en el plegamiento de proteínas) generó el árbol de la Figura 3–32. El árbol de la Figura 3–33 es un árbol "consenso" que utiliza diversas comparaciones como las descritas para realizar estimaciones sobre la relación evolutiva de grupos de organismos.

de su citoplasma por difusión. Pero al aumentar el tamaño de la célula disminuye la relación superficie/volumen hasta llegar a un punto en el que su metabolismo consume O_2 a una velocidad superior a la del suministro mediante difusión. Entonces el metabolismo que requiere O_2 se hará imposible cuando el tamaño celular crezca por encima de un determinado valor, que representará el límite teórico superior del tamaño de la célula.

Los seres vivos se pueden clasificar en tres dominios distintos

Todos los organismos vivos pertenecen a uno de los tres grandes grupos (dominios) que representan las tres ramas de la evolución a partir de un progenitor común **(Fig. 1–4)**. En base a consideraciones bioquímicas y genéticas se pueden distinguir dos grandes grupos: **Bacteria** y **Archaea.** Las bacterias habitan en el suelo, en las aguas superficiales y en los tejidos de otros organismos vivos o en descomposición. Muchas especies de Archaea, propuestas como un dominio distinto por Carl Woese en la década de 1980, habitan en medios muy extremos: lagos salinos, fuentes termales, ciénagas altamente acídicas y las profundidades de los océanos. Las pruebas de que se dispone sugieren que las arqueas y las bacterias divergieron pronto. Todos los organismos eucarióticos, que constituyen el tercer dominio, **Eukarya**, evolucionaron a partir de la misma rama que dio origen a las arqueas; los eucariotas están, por tanto, más estrechamente relacionados con las arqueas que con las bacterias.

FIGURA 1–5 Los organismos pueden clasificarse según su fuente principal de energía (luz solar o compuestos químicos oxidables) y su fuente de carbono para la síntesis de material celular.

Dentro de los dominios de Bacteria y Archaea existen subgrupos que se distinguen por sus hábitats. En los hábitats **aeróbicos,** con un abundante suministro de oxígeno, muchos organismos residentes obtienen su energía mediante la transferencia de electrones desde las moléculas de combustible al oxígeno. Otros ambientes son **anaeróbicos,** prácticamente privados de oxígeno, lo que obliga a que los microorganismos adaptados a ellos obtengan su energía mediante la transferencia de electrones hacia el nitrato (generando N_2), sulfato (generando H_2S) o CO_2 (generando CH_4). Muchos de los microorganismos que han evolucionado en estos ambientes anaeróbicos son anaerobios *obligatorios* que morirían por exposición al oxígeno. Otros son anaerobios *facultativos*, capaces de vivir con y sin oxígeno.

Los organismos pueden clasificarse en base a su forma de obtener la energía y el carbono que necesitan para la síntesis de material celular (resumido en la **Fig. 1–5**). Se pueden establecer dos amplias categorías en base a las fuentes de energía: los **fotótrofos** (del griego *trophē*, "nutrición") recolectan y utilizan la luz solar, mientras que los **quimiótrofos** obtienen su energía a partir de la oxidación de combustibles químicos. Algunos quimiótrofos, los **litótrofos,** oxidan combustibles inorgánicos: HS^- a S^0 (azufre elemental), S^0 a SO_4^-, NO_2^- a NO_3^-, o Fe^{2+} a Fe^{3+}, por ejemplo. Los **organótrofos** oxidan una amplia gama de compuestos orgánicos que se hallan en su entorno. Los fotótrofos y los quimiótrofos pueden también dividirse entre aquellos que obtienen todo el carbono necesario a partir de CO_2 **(autótrofos)** y los que requieren nutrientes orgánicos **(heterótrofos)**.

Escherichia coli es la bacteria mejor estudiada

Las células bacterianas comparten ciertas características estructurales comunes, pero también presentan especializaciones específicas de grupo **(Fig. 1–6)**. *E. coli* es un inquilino habitualmente inofensivo del tracto intestinal humano. La célula de *E. coli* tiene aproximadamente 2 μm de longitud y un poco menos de 1 μm de diámetro. Posee una membrana externa protectora y una membrana plasmática interna que engloba el citoplasma y el nucleoide. Entre las membranas interna y externa se sitúa una capa fina pero resistente de un polímero (peptidoglucano) que proporciona a la célula su forma y rigidez características. La membrana plasmática y las capas que la rodean constituyen la **envoltura celular.** Cabe observar que entre las arqueas la rigidez es conferida por una clase distinta de polímero (pseudopeptidoglucano). Las membranas plasmáticas de las bacterias consisten en una fina bicapa de moléculas de lípido en la que se insertan proteínas. Las membranas de las arqueas tienen una arquitectura similar, aunque sus lípidos difieren de los presentes en bacterias (véase la Fig. 10–12).

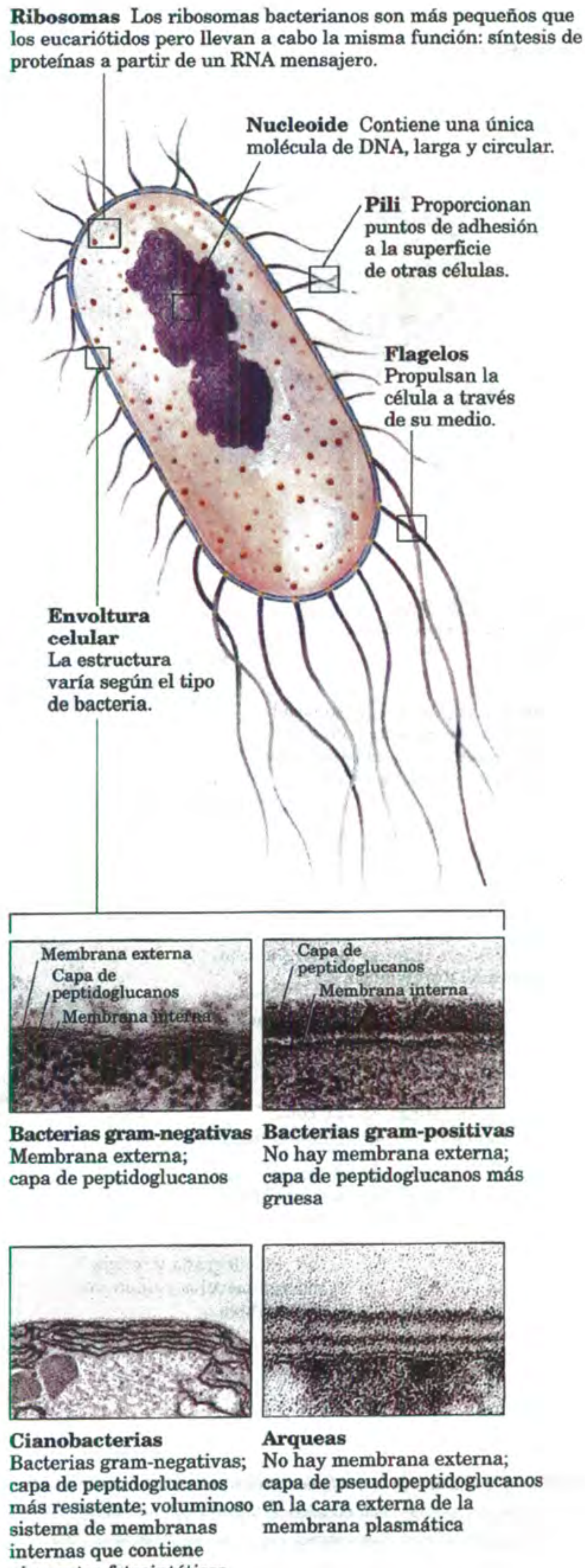


FIGURA 1–6 Características estructurales comunes de células bacterianas. A causa de diferencias en la estructura de la envoltura celular, algunas bacterias (bacterias gram-positivas) retienen la tinción de Gram (introducida por Hans Christian Gram en 1882) y otras no (bacterias gram-negativas). *E. coli* es gram-negativa. Las cianobacterias se distinguen por su voluminoso sistema de membranas internas, en el que se localizan los pigmentos fotosintéticos. Pese a que las envolturas celulares de las arqueas y las bacterias gram-positivas parecen similares al microscopio electrónico, la estructura de los lípidos de membrana y de los polisacáridos son muy diferentes en estos organismos (véase la Fig. 10–12).

El citoplasma de *E. coli* contiene aproximadamente 15.000 ribosomas, cantidades variables (de decenas a miles) de copias de cada uno de los 1.000 o más enzimas diferentes, quizás unos 1.000 compuestos orgánicos de masa molecular inferior a 1.000 (metabolitos y cofactores) y una variedad de iones inorgánicos. El nucleoide contiene una única molécula circular de DNA y el citoplasma (al igual que ocurre en la mayoría de bacterias) contiene uno o más segmentos circulares de DNA de tamaño menor que reciben el nombre de **plásmidos.** En la naturaleza, algunos plásmidos confieren resistencia a toxinas y antibióticos presen-

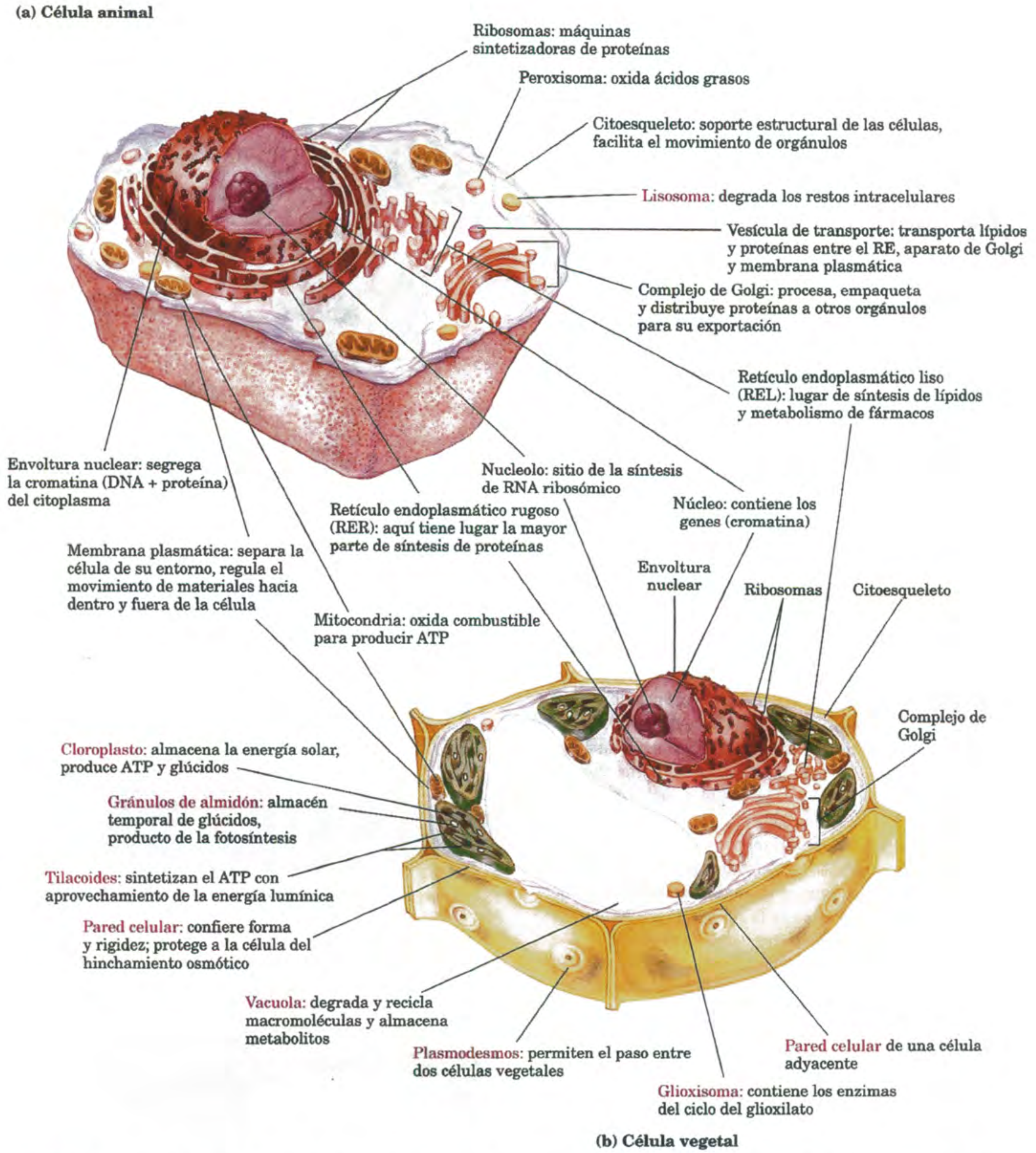


FIGURA 1–7 Estructura de la célula eucariótica. Ilustración esquemática de los dos principales tipos de célula eucariótica: **(a)** una célula animal representativa y **(b)** una célula vegetal representativa. Las células vegetales tienen entre 10 y 100 μm de diámetro, mayores que las células animales, que presentan un tamaño de 5 a 30 μm. Las estructuras rotuladas en rojo son exclusivas de células animales o vegetales. Los microorganismos eucarióticos (tales como protistas y hongos) tienen estructuras similares a las de las células animales y vegetales pero pueden contener también orgánulos especializados no ilustrados aquí.

tes en el medio. En el laboratorio, estos segmentos de DNA son especialmente adecuados para la manipulación experimental y constituyen herramientas poderosas en ingeniería genética (véase el Capítulo 9).

La mayor parte de bacterias (incluida *E. coli*) existen como células individuales, aunque en algunos grupos bacterianos, como por ejemplo en las mixobacterias, sus células muestran un comportamiento social primitivo y forman agregados compuestos por un gran número de células.

Las células eucarióticas poseen diversos orgánulos membranosos que pueden aislarse para su estudio

Las células eucarióticas típicas **(Fig. 1–7)** son mucho mayores que las bacterias: tienen normalmente un diámetro de 5 a 100 μm y un volumen celular que es entre mil y un millón de veces superior al de las bacterias. Las características distintivas de los eucariotas son el núcleo y los orgánulos rodeados de membrana que llevan a cabo funciones específicas: mitocondrias, retículo endoplasmático, complejos de Golgi, peroxisomas y lisosomas. Las células vegetales contienen, además, vacuolas y cloroplastos (Fig. 1–7). En el citoplasma de muchas células también se observan gránulos o gotículas que contienen nutrientes de reserva como almidón o grasas.

En lo que constituyó un importante avance bioquímico, Albert Claude, Christian de Duve y George Palade desarrollaron métodos para la separación individualizada de orgánulos citosólicos, un paso esencial para la investigación de su estructura y función. En un procedimiento de fraccionamiento celular típico **(Fig. 1–8)** se procede a disgregar células o tejidos en disolución mediante una homogeneización suave. Este tratamiento rompe la membrana plasmática pero respeta la integridad de la

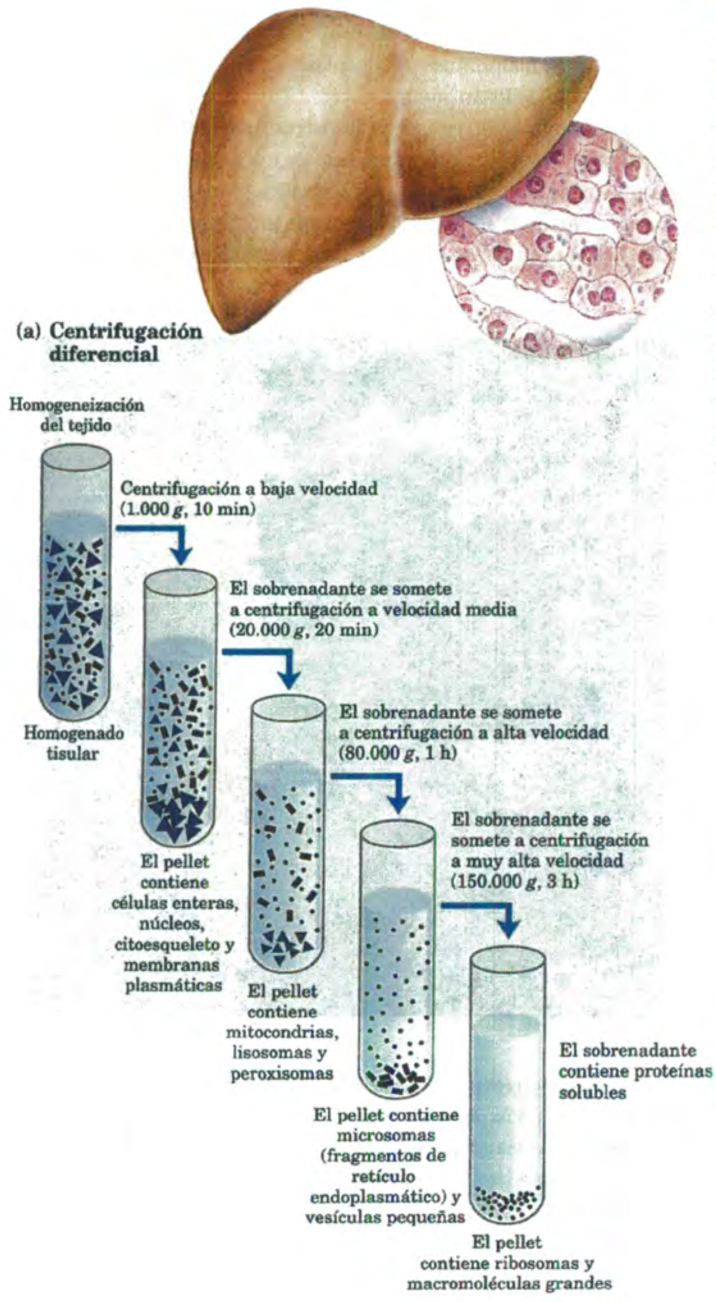
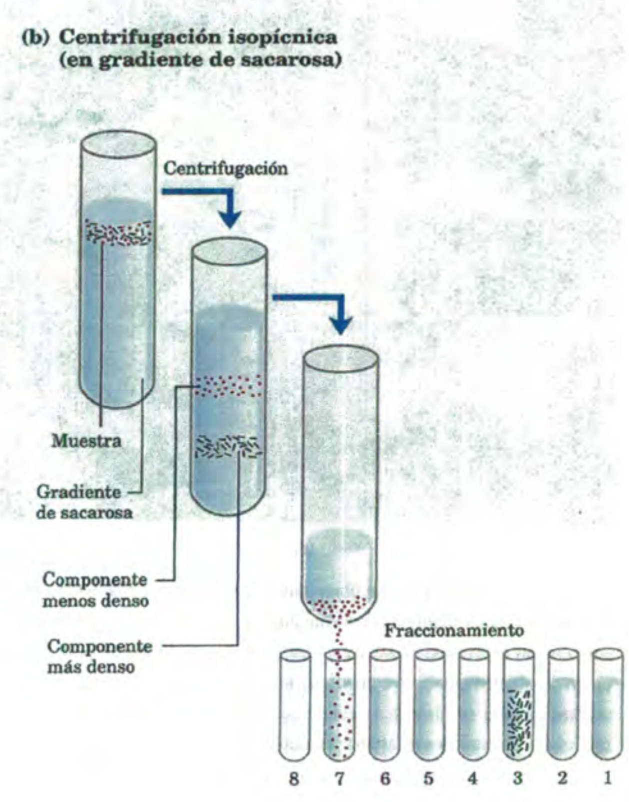


FIGURA 1–8 Fraccionamiento subcelular de un tejido. En primer lugar se homogeneiza mecánicamente un tejido, como por ejemplo el hígado, para romper las células y dispersar su contenido en un medio acuoso. El medio de sacarosa tiene una presión osmótica similar a la de los orgánulos, equilibrando la difusión de agua hacia fuera y hacia el interior de los orgánulos, que se hincharían y romperían en una disolución de menor osmolaridad (véase la Fig. 2–12). **(a)** Las partículas en suspensión de diferente tamaño se pueden separar por centrifugación a diferentes velocidades, o bien **(b)** partículas con diferente densidad se pueden separar mediante centrifugación isopícnica. En la centrifugación isopícnica se llena un tubo de centrífuga con una disolución, la densidad de la cual aumenta desde la superficie hasta el fondo; para producir este gradiente de densidad se disuelve un soluto como sacarosa a diferentes concentraciones. Cuando se deposita una mezcla de orgánulos sobre este gradiente de densidad y se centrifuga el tubo a alta velocidad, los orgánulos individuales sedimentan hasta que su densidad de flotación corresponde exactamente con la del gradiente. Entonces puede recogerse cada capa por separado.



mayoría de los orgánulos. A continuación se centrifuga el homogeneizado, proceso en el que los orgánulos tales como el núcleo, las mitocondrias y los lisosomas sedimentan a velocidades diferentes a causa de su diferente tamaño.

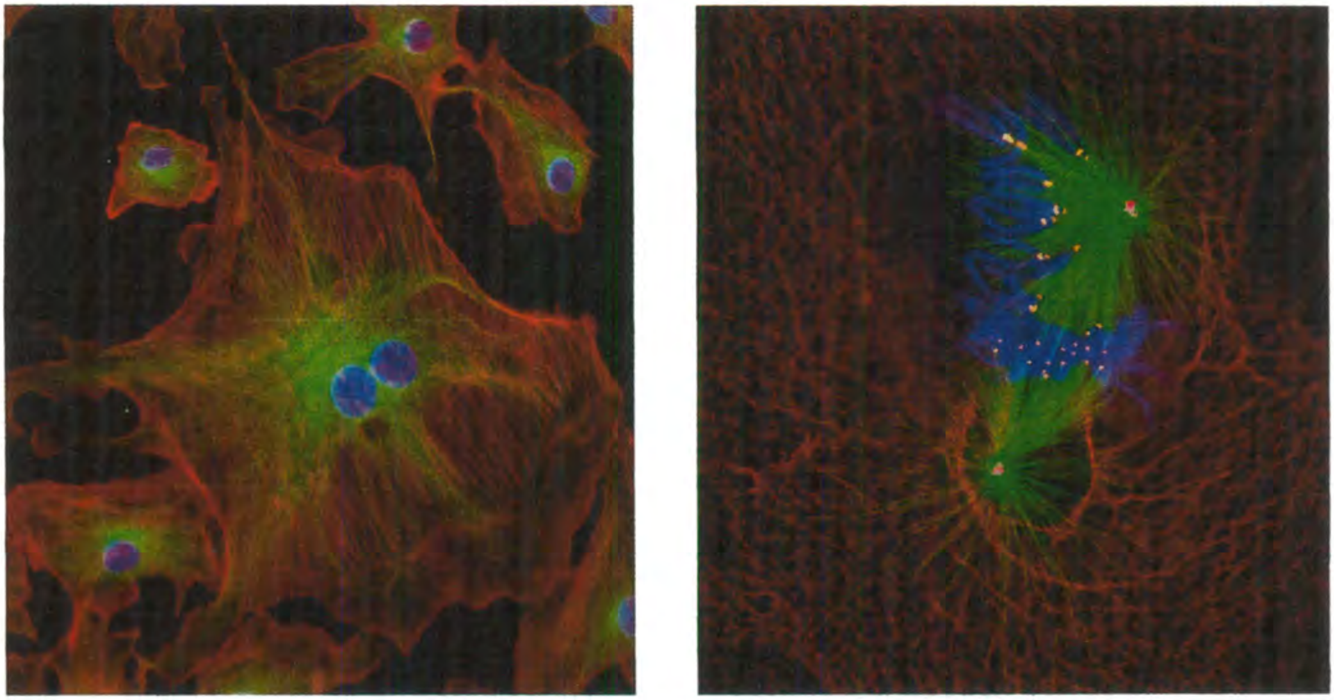
La centrifugación diferencial permite obtener un fraccionamiento inicial grosero del contenido citoplasmático, que puede purificarse con más precisión mediante una centrifugación isopícnica ("misma densidad"). Mediante esta metodología, los orgánulos de densidad de flotación diferente (resultado de las diferentes relaciones entre cantidad de lípidos y proteínas en cada clase de orgánulo) se separan por centrifugación a través de una columna de disolvente que contiene un gradiente de densidad. Recogiendo cuidadosamente el material de cada región del gradiente y observándolo al microscopio, el bioquímico puede establecer la posición de sedimentación de cada orgánulo y purificarlo para su estudio posterior. De esta manera se supo, por ejemplo, que los lisosomas contienen enzimas degradativos, que las mitocondrias contienen enzimas oxidativos y que los cloroplastos contienen pigmentos fotosintéticos. El aislamiento de un orgánulo enriquecido en un cierto enzima suele ser el primer paso en la purificación de dicho enzima.

El citoplasma se organiza gracias al citoesqueleto y es altamente dinámico

La microscopía de fluorescencia permite observar distintos tipos de filamentos de proteína que se entrecruzan en la célula eucariótica y forman una trama tridimensional e interconectada, el **citoesqueleto.** Existen tres clases principales de filamentos citoplasmáticos –los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios **(Fig. 1–9)**– que difieren en anchura (entre 6 y 22 nm), composición y función específica. Todos ellos proporcionan estructura y organización al citoplasma y mantienen la forma de la célula. Los filamentos de actina y los microtúbulos colaboran también en el movimiento de los orgánulos o en el movimiento celular global.

Cada tipo de componente citoesquelético está compuesto por subunidades simples de proteína que se asocian de manera no covalente para dar filamentos de grosor uniforme. Estos filamentos no son estructuras permanentes, sino que se encuentran en constante fluctuación entre su forma monomérica y su forma estructurada en filamentos. Su localización celular no está fijada rígidamente, sino que varía en gran medida durante la mitosis, la citoquinesis, el desplazamiento ameboide o a causa de los cambios en la forma de la célula. La regulación de la formación, disgregación y localización de los diversos tipos de filamentos corre a cargo de otras proteínas encargadas de unir o entrelazar los filamentos o de desplazar orgánulos citoplasmáticos a lo largo de los mismos.

De este breve repaso de la estructura celular podemos extraer la idea general de que la célula eucariótica está formada por una trama de fibras estructurales y un complejo sistema de compartimientos limitados por membranas (Fig. 1–7). Los filamentos se desagregan para reestructurarse en otro



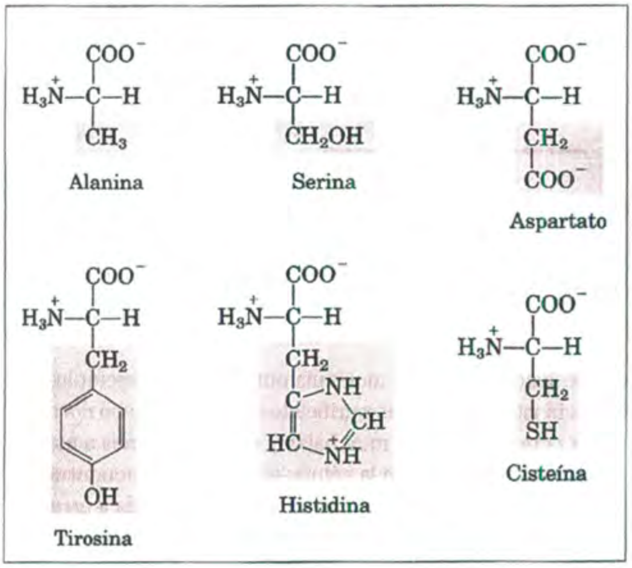
(a) (b)

FIGURA 1–9 Los tres tipos de filamentos citoplasmáticos: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Se pueden marcar estructuras celulares con un anticuerpo (molécula capaz de reconocer una proteína específica) unido covalentemente a un compuesto fluorescente. Las estructuras teñidas son visibles cuando se observa la célula con un microscopio de fluorescencia. **(a)** Células endoteliales de arteria pulmonar bovina. Los haces de filamentos de actina, llamados "fibras de estrés", están teñidos en rojo; los microtúbulos, que irradian desde el centro de la célula, en verde, y los cromosomas del núcleo en azul. **(b)** Una célula pulmonar de tritón durante la mitosis. Los microtúbulos (verde), unidos a estructuras llamadas cinetocoros (amarillo) sobre los cromosomas condensados (azul), arrastran a los cromosomas hacia los polos opuestos, o centrosomas (magenta), de la célula. Los filamentos intermedios, formados por queratina (rojo), mantienen la estructura de la célula.

lugar distinto. Las vesículas membranosas brotan de un orgánulo y se fusionan con otro. Los orgánulos se mueven por el citoplasma a lo largo de filamentos de proteína gracias a la energía de motores proteicos. El **sistema endomembranoso** segrega procesos metabólicos específicos, y aporta las superficies en las que tienen lugar ciertas reacciones enzimáticas. La **exocitosis** y la **endocitosis,** mecanismos de transporte (hacia el exterior y el interior de las células, respectivamente) que implican fusión y fisión de membranas, permiten la comunicación entre el citoplasma y su medio externo mediante la secreción de sustancias producidas en la célula y la captación de material extracelular.

A pesar de su complejidad, la organización del citoplasma está lejos de ser el producto del azar. El movimiento y la posición de los orgánulos y de los elementos del citoesqueleto están sometidos a una estrecha regulación y en el transcurso de la vida de la célula se producen importantes reorganizaciones finamente orquestadas, tales como la mitosis. Las interacciones entre citoesqueleto y orgánulos son reversibles, de tipo no covalente y están sujetas a regulación en respuesta a diversas señales intra y extracelulares.

(a) Algunos de los aminoácidos de las proteínas

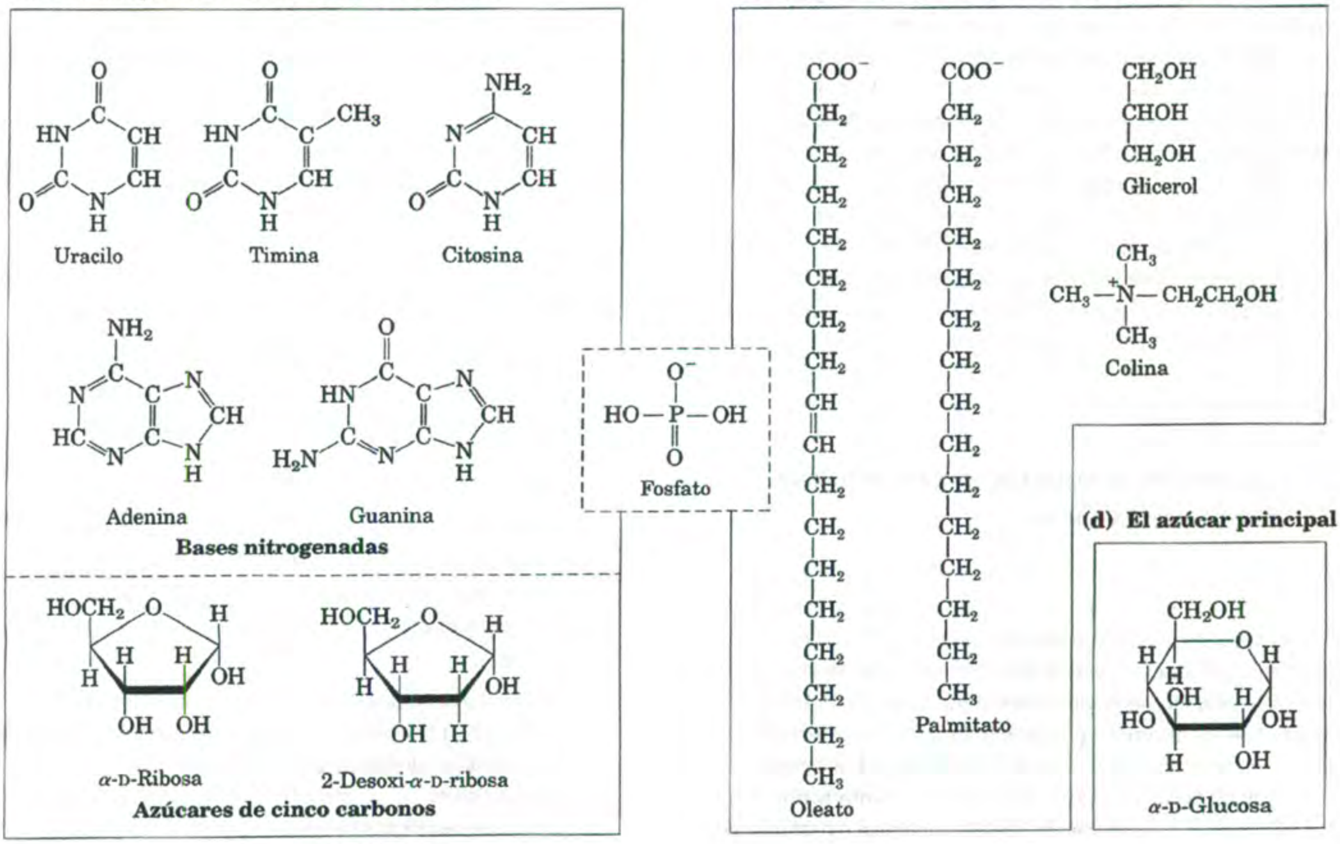


Las células construyen estructuras supramoleculares

Las macromoléculas y sus subunidades monoméricas son de tamaño muy diferente **(Fig. 1–10)**. Una molécula de alanina mide menos de 0,5 nm. Una molécula de hemoglobina, la proteína transportadora de oxígeno en los eritrocitos (células rojas de la sangre), contiene cerca de 600 subunidades de aminoácido formando cuatro largas cadenas que se pliegan de forma globular y se asocian en estructuras de 5,5 nm de diámetro. Las proteínas

FIGURA 1–10 Los compuestos orgánicos a partir de los cuales se forman la mayoría de los componentes celulares: el ABC de la bioquímica. (a) Seis de los veinte aminoácidos a partir de los cuales se construyen todas las proteínas (las cadenas laterales se destacan en rosa); **(b)** las cinco bases nitrogenadas, dos azúcares de cinco carbonos y el ión fosfato a partir de los cuales se construyen todos los ácidos nucleicos; **(c)** cinco componentes de lípidos de membrana, y **(d)** D-glucosa, el azúcar a partir del cual se derivan la mayor parte de los glúcidos. Nótese que el fosfato es un componente tanto de los ácidos nucleicos como de las membranas lipídicas.

(b) Los componentes de los ácidos nucleicos **(c) Algunos de los componentes de los lípidos**



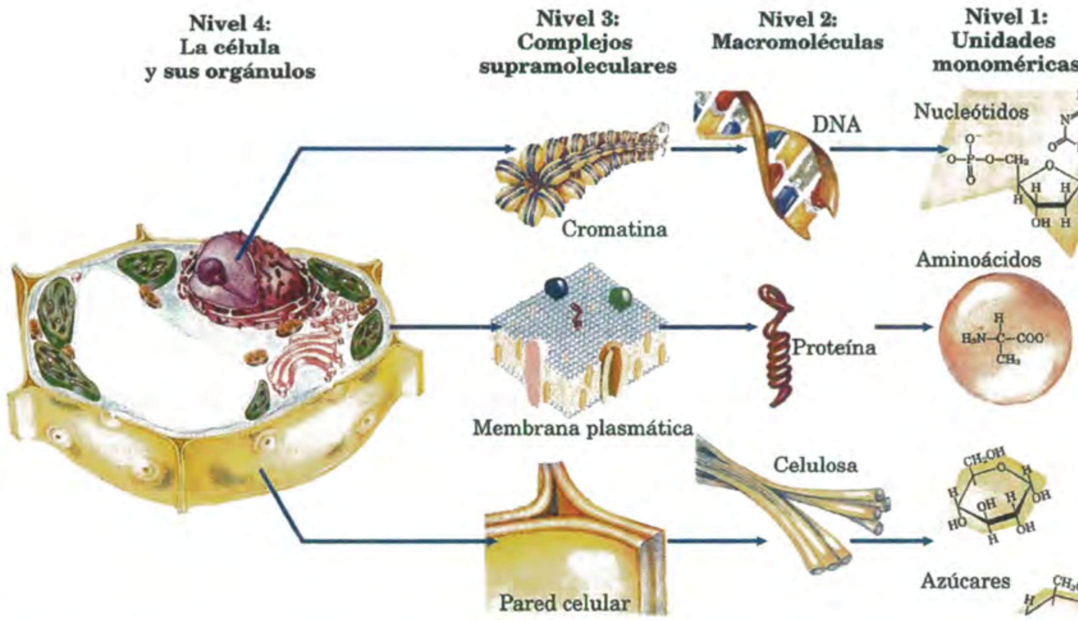


FIGURA 1–11 Jerarquía estructural en la organización molecular de las células. En esta célula vegetal, el núcleo es un orgánulo que contiene diversos tipos de complejos supramoleculares, entre ellos la cromatina. La cromatina consiste en dos tipos de macromoléculas, DNA y muchas proteínas diferentes, cada una formada a partir de subunidades simples.

son, a su vez, mucho menores que los ribosomas (cuyo diámetro es de aproximadamente 20 nm), orgánulos, a su vez, de tamaño muy inferior al de las mitocondrias que miden aproximadamente 1.000 nm de diámetro. Existe, pues, una gran diferencia entre las biomoléculas simples y las estructuras que pueden observarse al microscopio óptico. La **Figura 1–11** ilustra la jerarquía estructural en la organización celular.

Las subunidades monoméricas de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos se unen mediante enlaces covalentes. Sin embargo, en complejos supramoleculares, las macromoléculas se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes, individualmente, mucho más débiles que los enlaces covalentes. Entre las interacciones no covalentes se cuentan los enlaces de hidrógeno (entre grupos polares), las interacciones iónicas (entre grupos cargados), las interacciones hidrofóbicas (entre grupos apolares en disolución acuosa) y las interacciones de van der Waals (fuerzas de London), todas ellas de energía considerablemente menor que la de los enlaces covalentes. Las interacciones no covalentes se describen en el Capítulo 2. Los complejos supramoleculares se estabilizan gracias al gran número de interacciones débiles que se establecen en ellos y que son las responsables de sus estructuras únicas.

Los estudios in vitro podrían no detectar interacciones importantes entre moléculas

Uno de los métodos para entender un proceso biológico consiste en el estudio de las moléculas purificadas in vitro (en el interior del tubo de ensayo), evitando la interferencia con otras moléculas presentes en la célula intacta, es decir, in vivo. A pesar de que esta metodología ha resultado muy útil, debemos recordar que el interior de una célula es muy diferente del entorno que pueda haber en un tubo de ensayo. Los componentes que "interfieren" y que se eliminan mediante purificación pueden resultar críticos para la función biológica o para la regulación de la actividad de la molécula purificada. Por ejemplo, los estudios in vitro de enzimas purificados se llevan a cabo normalmente a concentraciones muy bajas y en disoluciones acuosas en agitación constante. En la célula, el enzima se encuentra disuelto o suspendido en un citosol de textura parecida a un gel y acompañado de miles de proteínas diferentes, algunas de las cuales se unen al enzima y varían su actividad. Algunos enzimas forman parte de complejos multienzimáticos en los que los reactivos se canalizan de un enzima a otro sin que lleguen a tener contacto con el disolvente. La difusión está limitada por la densidad del citosol tipo gel, cuya composición varía en sus distintas regiones. Resumiendo, una molécula determinada puede actuar de modo muy diferente en la célula que in vitro. Uno de los retos de la bioquímica consiste en comprender la influencia de la organización celular y las asociaciones moleculares en la función de enzimas y otras biomoléculas: comprender la función tanto in vivo como in vitro.

RESUMEN 1.1 Fundamentos celulares

- Todas las células están rodeadas por una membrana plasmática; poseen un citosol que contiene metabolitos, coenzimas, iones inorgánicos y enzimas, y poseen un conjunto de genes contenidos en un nucleoide (bacterias y arqueas) o un núcleo (eucariotas).
- Los fotótrofos utilizan la luz del sol para realizar trabajo; los quimiótrofos oxidan combustibles mediante la transferencia de electrones a buenos aceptores electrónicos: compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos u oxígeno molecular.
- Las células bacterianas o las arqueas contienen un citosol, un nucleoide y plásmidos. Las células eucarióticas tienen núcleo y están multicompartimentadas, con ciertos procesos confinados en orgánulos específicos; estos orgánulos se pueden separar para su estudio de modo aislado.

FIGURA 1–12 Los elementos esenciales para la vida y la salud de los animales. Los elementos mayoritarios (sobre fondo naranja) son componentes estructurales de células y tejidos y deben estar presentes en la dieta diaria en cantidad de gramos. Las necesidades de oligoelementos (sobre fondo amarillo) son mucho menores: en el caso del ser humano son suficientes unos pocos miligramos al día de Fe, Cu, y Zn, e incluso menos de los demás elementos. Las necesidades elementales de las plantas y los microorganismos son muy similares a las aquí presentadas. Son, en cambio, variadas, las formas en que adquieren estos elementos.

- Las proteínas del citoesqueleto se ensamblan formando largos filamentos que confieren forma y rigidez a las células y son el soporte para el movimiento de los orgánulos a través de la célula.
- Los complejos supramoleculares se mantienen estables mediante interacciones no covalentes y dan lugar a una jerarquía de estructuras, algunas de las cuales son visibles al microscopio óptico. Interacciones importantes en el medio celular pueden perderse debido a la eliminación de moléculas individuales para su estudio in vitro.

1.2 Fundamentos químicos

La bioquímica tiene como objetivo explicar en términos químicos las estructuras y las funciones biológicas. A finales del siglo XVIII los químicos llegaron a la conclusión de que la composición de la materia viva era sorprendentemente diferente de la del mundo inanimado. Antoine Lavoisier (1743-1794) observó la relativa simplicidad química del "mundo mineral" en contraste con la complejidad de los "mundos animal y vegetal"; se sabía que estos últimos estaban formados por compuestos ricos en carbono, oxígeno, nitrógeno y fósforo.

Durante la primera mitad del siglo XX, investigaciones bioquímicas paralelas acerca de la degradación de la glucosa en levaduras y en células musculares de animales permitieron observar grandes similitudes químicas en estos dos tipos de células, aparentemente muy diferentes; la degradación de la glucosa en la levadura y en células musculares tiene lugar a través de los mismos 10 intermediarios químicos y los mismos 10 enzimas. Estudios posteriores sobre muchos otros procesos bioquímicos en un gran número de organismos diferentes confirmó la universalidad de esta observación, claramente resumida por Jacques Monod: "Lo que es cierto para *E. coli* es cierto para el elefante". La noción actual de que todos los organismos comparten un origen evolutivo común se basa en parte en esta universalidad de intermediarios y transformaciones químicas, frecuentemente denominada "unidad bioquímica".

Menos de 30 de los más de 90 elementos químicos presentes en la naturaleza son esenciales para los seres vivos. La mayoría de los elementos de la materia viva tienen un número atómico relativamente bajo, y sólo dos de ellos tienen un número atómico superior al del selenio, 34 **(Fig. 1–12)**. Los cuatro elementos más abundantes en los organismos vivos, en términos de porcentaje sobre el número total de átomos, son el hidrógeno, el oxígeno, el nitrógeno y el carbono que, en conjunto, representan más del 99% de la masa de la mayoría de las células. Son los elementos más ligeros capaces de formar uno, dos, tres y cuatro enlaces covalentes, respectivamente; en general, los elementos más ligeros forman los enlaces más fuertes. Los oligoelementos (Fig. 1–12) representan una fracción minúscula del peso del cuerpo humano, pero todos ellos son esenciales para la vida, generalmente a causa de que resultan imprescindibles para la función de proteínas específicas, incluidos los enzimas. La capacidad transportadora de oxígeno de la molécula de hemoglobina, por ejemplo, depende totalmente de cuatro iones hierro que constituyen sólo el 0,3% de su masa.

Las biomoléculas son compuestos de carbono con una diversidad de grupos funcionales

La química de los organismos vivos se organiza alrededor del carbono, que representa más de la mitad del peso seco de las células. El carbono puede formar enlaces simples con átomos de hidrógeno y tanto enlaces simples como dobles con los átomos de oxígeno y de nitrógeno **(Fig. 1–13)**. La capacidad de los átomos de

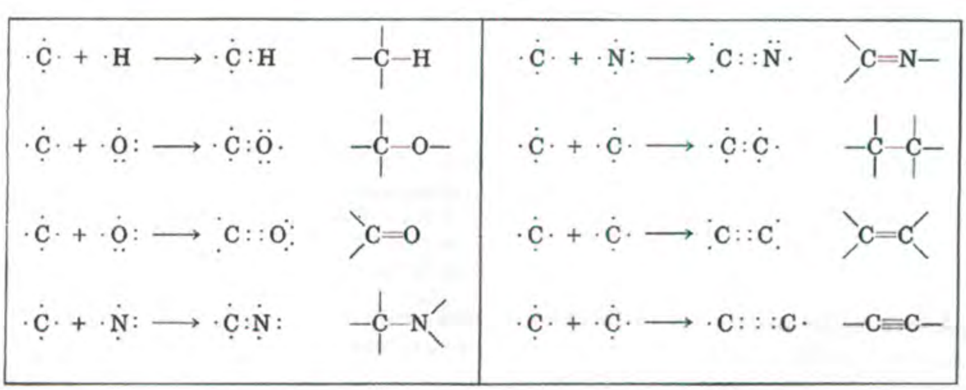


FIGURA 1–13 Versatilidad de enlace del carbono. El carbono puede formar enlaces covalentes simples, dobles y triples (todos los enlaces en rojo), en particular con otros átomos de carbono. Los enlaces triples son muy poco frecuentes en biomoléculas.

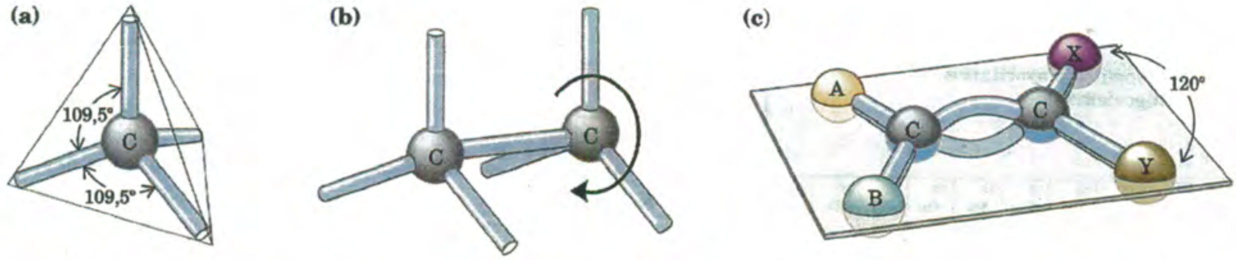


FIGURA 1–14 Geometría de los enlaces del carbono. **(a)** Los átomos de carbono presentan la distribución tetraédrica característica de sus cuatro enlaces simples. **(b)** Los enlaces simples carbono-carbono presentan libertad de rotación, que aquí se muestra para el etano (CH_3—CH_3). **(c)** Los enlaces dobles son más cortos y no permiten la libre rotación. Los dos carbonos unidos por el enlace doble y los átomos A, B, X e Y están situados en el mismo plano rígido.

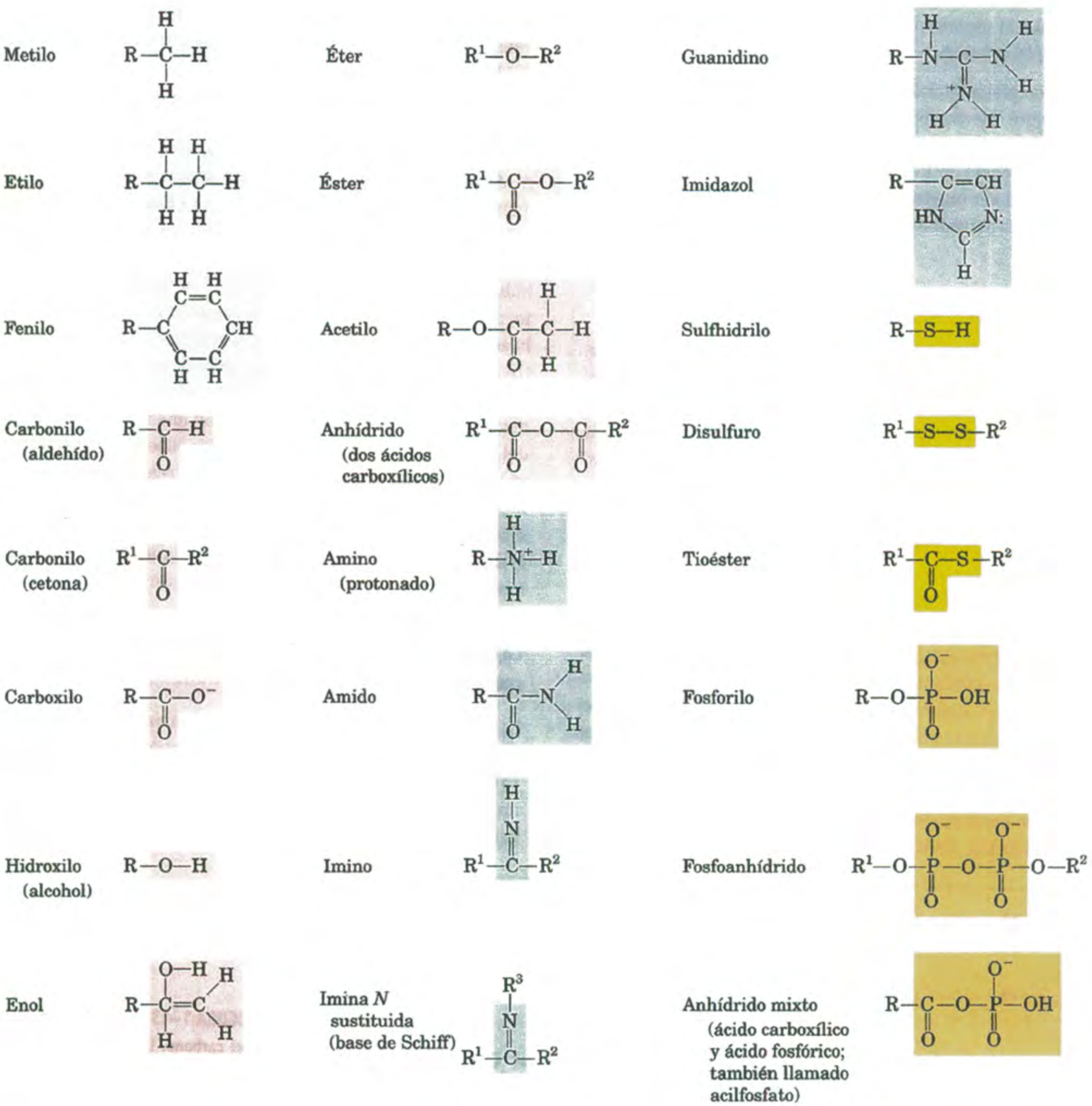


FIGURA 1–15 Algunos grupos funcionales comunes de las biomoléculas. En esta figura, así como en otras a lo largo de todo el libro, se utiliza la R para representar un "sustituyente cualquiera". Puede ser tan sencillo como un átomo de hidrógeno, pero normalmente es un grupo que contiene carbono. Cuando se representan dos o más sustituyentes en una molécula, se emplea el superíndice R^1, R^2, etc.

carbono para formar enlaces simples carbono-carbono de gran estabilidad resulta de gran trascendencia en la biología. Cada átomo de carbono puede formar enlaces simples muy estables con un máximo de hasta otros cuatro átomos de carbono. Dos átomos de carbono pueden compartir también dos (o tres) pares de electrones, dando lugar a enlaces carbono-carbono dobles (o triples).

Los cuatro enlaces simples que puede formar un átomo de carbono se proyectan desde el núcleo a los cuatro vértices de un tetraedro **(Fig. 1–14)**, con un ángulo de 109,5° entre dos de ellos y una longitud media de enlace de 0,154 nm. Existe libertad de rotación alrededor de cada enlace simple a no ser que ambos átomos de carbono estén unidos a grupos muy voluminosos o cargados, en cuyo caso la rotación puede estar restringida. Un enlace doble carbono-carbono es más corto (mide aproximadamente 0,134 nm) y rígido, y sólo permite una rotación limitada alrededor de su eje.

Los átomos de carbono enlazados covalentemente en las biomoléculas pueden formar cadenas lineares, ramificadas y estructuras cíclicas. Es probable que la versatilidad de enlace del carbono consigo mismo y con otros elementos fuera una de las causas principales de la selección de los compuestos de carbono para formar parte de la maquinaria molecular de las células durante el origen y la evolución de los seres vivos. Ningún otro elemento químico puede formar moléculas con formas y tamaños tan diferentes o con tanta variedad de grupos funcionales.

Puede considerarse que la mayor parte de las biomoléculas son derivados de los hidrocarburos, con átomos de hidrógeno reemplazados por una amplia gama de grupos funcionales que confieren propiedades químicas específicas para dar lugar a las diferentes familias de compuestos orgánicos. Las familias más comunes de compuestos orgánicos son los alcoholes, con uno o más grupos hidroxilo; las aminas, que tienen grupos amino; los aldehídos y las cetonas, con grupos carbonilo, y los ácidos carboxílicos, que tienen unidos grupos carboxilo **(Fig. 1–15)**. Muchas biomoléculas son polifuncionales y contienen dos o más tipos de grupos funcionales **(Fig. 1–16)**, cada uno de ellos con propiedades químicas y reactividad propias. La "personalidad" química de cada compuesto viene determinada por la química de sus grupos funcionales y su disposición en el espacio tridimensional.

Las células contienen un conjunto universal de moléculas pequeñas

En la fase acuosa de una célula (citosol) se encuentra disuelta una colección de quizá un millar de pequeñas moléculas orgánicas diferentes (M_r ~100 a ~500), que son los metabolitos centrales de las rutas principales presentes en la práctica totalidad de las células: los metabolitos y rutas que se han conservado a lo largo de la evolución. (En el Recuadro 1–1 se encuentra una explicación de las diversas maneras de referirse al peso molecular de una sustancia.) En este conjunto de moléculas se incluyen los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y sus derivados fosforilados y ciertos ácidos mono-, di- y tricarboxílicos. Las moléculas son polares o cargadas, solubles en agua y se encuentran en concentraciones que van desde micromolar a milimolar. Están atrapadas dentro de la célula porque la membrana plasmática es impermeable a ellas, aunque algunos transportadores específicos de membrana pueden catalizar el movimiento de ciertas moléculas hacia el interior o el exterior de la célula o entre compartimientos de las células eucarióticas. La presencia universal del mismo conjunto de compuestos en las células vivas es una manifestación de la conservación evolutiva de las rutas metabólicas que se desarrollaron en las células primitivas.

Existen otras biomoléculas pequeñas que son específicas para ciertos tipos de células u organismos. Por ejemplo, las plantas vasculares contienen, además de los metabolitos ya

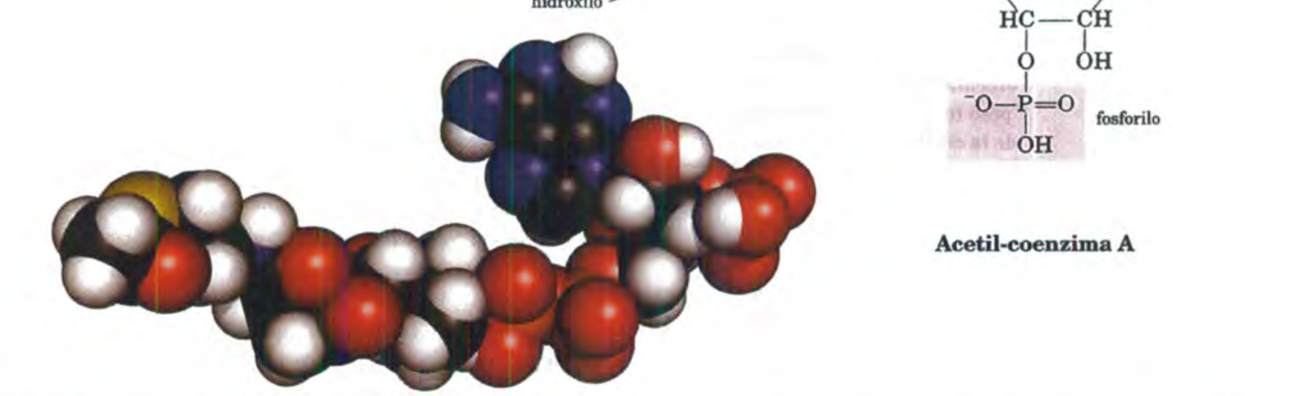


FIGURA 1–16 Algunos grupos funcionales comunes en una única biomolécula. El acetil-coenzima A (comúnmente abreviado acetil-CoA) es portador de grupos acetilo en algunas reacciones enzimáticas. Los grupos funcionales se identifican en la fórmula estructural. Como veremos en el Capítulo 2, algunos de estos grupos funcionales pueden existir en su forma protonada o desprotonada, dependiendo del pH. En el modelo espacial, N es azul, C es negro, P es naranja, O es rojo y H es blanco. El átomo amarillo de la izquierda es el azufre del importante enlace tioéster que se forma entre el acetilo y el coenzima A.

RECUADRO 1–1 Peso molecular, masa molecular y las unidades que deben utilizarse

Existen dos maneras comunes y equivalentes para definir la masa molecular y ambas se utilizan en este texto. La primera es el *peso molecular*, o la *masa molecular relativa*, representados por el símbolo M_r. El peso molecular de una sustancia se define como la relación entre la masa de una molécula de esta sustancia y la duodécima parte de la masa del carbono-12 (^{12}C). Al ser una relación, M_r no tiene dimensiones, no tiene unidades asociadas. La segunda es la *masa molecular*, representada por m. Ésta es simplemente la masa de una molécula, o la masa molecular dividida por el número de Avogadro. La masa molecular, m, se expresa en daltons (abreviado Da). Un dalton equivale a una duodécima parte de la masa del carbono-12; un kilodalton (kDa) equivale a 1.000 daltons, y un megadalton (MDa) a un millón de daltons.

Considérese, por ejemplo, una molécula de masa 1.000 veces la del agua. De esta molécula podemos decir lo siguiente: M_r = 18.000 o m = 18.000 daltons. También la podemos describir como "una molécula de 18 kDa". Sin embargo, la expresión M_r = 18.000 daltons es incorrecta.

Otra unidad para describir la masa de un único átomo o una única molécula es la unidad de masa atómica (antes denominada uma, abreviatura que ha sido cambiada por u). Una unidad de masa atómica (1 u) se define como la duodécima parte de la masa de un átomo de carbono-12. Puesto que la masa de un átomo de carbono-12 medida experimentalmente es de $1{,}9926 \times 10^{-23}$ g, 1 u = $1{,}6606 \times 10^{-24}$ g. La unidad de masa atómica resulta adecuada para describir, por ejemplo, la masa de un pico observado por espectrometría de masas (véase el Recuadro 3–2).

comentados de carácter universal, otras moléculas pequeñas denominadas **metabolitos secundarios,** que juegan un papel específico en la vida de la planta. Entre estos metabolitos se incluyen compuestos que proporcionan a las plantas su aroma característico y otros, como la morfina, la quinina, la nicotina y la cafeína, apreciados por sus efectos fisiológicos en humanos pero que desempeñan otras funciones en las plantas.

El conjunto de moléculas pequeñas de una célula determinada ha recibido el nombre de **metaboloma** de la célula, sugiriendo un paralelismo con el término "genoma" (definido anteriormente y que se comentará más ampliamente en la sección 1.5).

Las macromoléculas son los principales constituyentes de las células

Gran parte de las moléculas biológicas son **macromoléculas,** polímeros de masa molecular superior a ~5.000 construidos a partir de precursores relativamente simples. Los polímeros más cortos se denominan **oligómeros** (del griego *oligos*, "pocos"). Las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos son macromoléculas compuestas de monómeros de masa molecular igual o inferior a 500. La síntesis de macromoléculas es una de las actividades celulares que más energía consume. Las macromoléculas pueden formar posteriormente estructuras supramoleculares complejas, dando lugar a unidades funcionales tales como los ribosomas. En la Tabla 1–1 se muestran las principales clases de biomoléculas en una célula de *E. coli*.

TABLA 1–1 Componentes moleculares de *E. coli*

	Porcentaje de peso total de la célula	Número aproximado de especies moleculares diferentes
Agua	70	1
Proteínas	15	3.000
Ácidos nucleicos		
DNA	1	1–4
RNA	6	>3.000
Polisacáridos	3	10
Lípidos	2	20
Subunidades monoméricas e intermediarios	2	500
Iones inorgánicos	1	20

Las **proteínas,** largos polímeros de aminoácidos, constituyen, excluyendo el agua, la fracción celular más importante. Algunas proteínas tienen propiedades catalíticas y actúan como enzimas, y otras sirven como elementos estructurales, receptores de señales o transportadores que acarrean sustancias específicas hacia o desde el interior de las células. Las proteínas son quizá las biomoléculas más versátiles y el catálogo de sus muchas funciones resultaría muy largo. La suma de todas las proteínas que funcionan en una célula se denomina su **proteoma.** Los **ácidos nucleicos,** DNA y RNA, son polímeros de nucleótidos. Almacenan y transmiten la información genética, y algunas moléculas de RNA desempeñan papeles estructurales y catalíticos en complejos supramoleculares. Los **polisacáridos,** polímeros de azúcares simples tales como la glucosa, tienen tres funciones principales: sirven como almacén de combustibles energéticos, como componentes estructurales rígidos de las paredes celulares (en plantas y bacterias) y como elementos de reconocimiento extracelular que se unen a proteínas de otras células. Los polímeros más cortos de azúcares (oligosacáridos) actúan como señales específicas cuando se presentan unidos a proteínas o lípidos de la superficie celular. Los **lípidos,** derivados de hidrocarburos insolubles en agua, sirven como componentes estructurales de las membranas, reserva de combustible rico en energía, pigmentos y señales intracelulares.

Proteínas, polinucleótidos y polisacáridos tienen un gran número de subunidades monoméricas y por tanto grandes masas moleculares: entre 5.000 y más de 1 millón en proteínas, hasta varios *miles de millones* en ácidos nucleicos y del orden de millones en polisacáridos tales como el almidón. Las moléculas individuales de lípido son mucho más pequeñas (M_r 750 a 1.500) y no se consideran macromoléculas. Sin embargo, pueden formar estructuras muy grandes por asociación no covalente. Las membranas celulares se construyen a partir de enormes agregados no covalentes de moléculas de lípidos y de proteínas.

Dadas sus secuencias a base de subunidades y ricas en información, se suele definir a las proteínas y a los ácidos nucleicos como **macromoléculas informativas.** Como se ha dicho antes, algunos oligosacáridos actúan también como moléculas informativas.

La estructura tridimensional se describe en términos de configuración y conformación

Los enlaces covalentes y los grupos funcionales de las biomoléculas son de importancia central para su función, del mismo modo que resulta de crucial importancia la distribución de los átomos de una biomolécula en el espacio tridimensional (su estereoquímica). Los compuestos de carbono existen normalmente como **estereoisómeros,** moléculas que contienen los mismos enlaces químicos pero con diferente **configuración** o distribución espacial de sus átomos constituyentes. Las interacciones entre las biomoléculas son invariablemente **estereoespecíficas,** lo que implica que las moléculas que interactúan tengan una configuración específica.

La **Figura 1–17** muestra tres formas de ilustrar la estructura estereoquímica o configuración de moléculas sencillas. El diagrama en perspectiva especifica la estereoquímica sin ambigüedad, pero los ángulos y las distancias de enlace se representan mejor con modelos de bolas y varillas. En los modelos espacialmente llenos el radio de cada átomo es proporcional a su radio de van der Waals y los contornos del modelo definen el espacio ocupado por la molécula (el volumen del que quedan excluidos los átomos de otras moléculas).

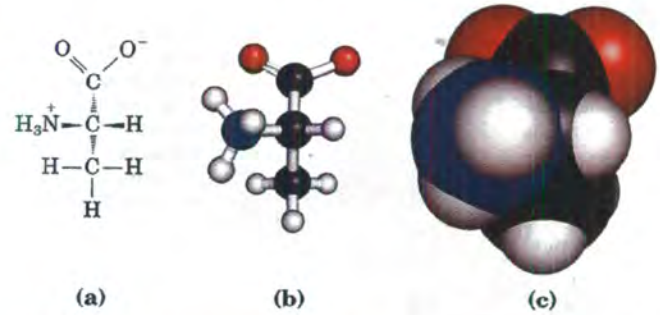
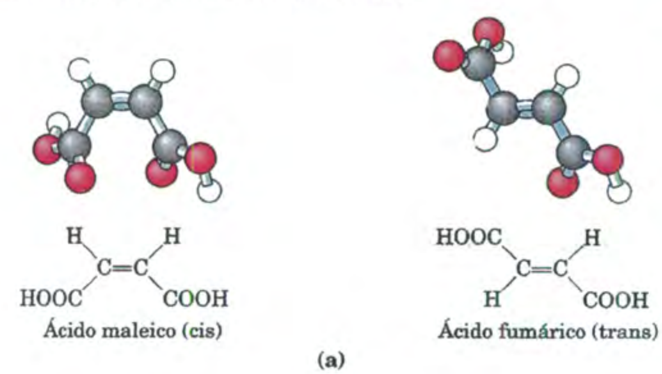


FIGURA 1–17 Representación de moléculas. Tres maneras de representar la estructura del aminoácido alanina (mostrado aquí en forma iónica, que es la que se encuentra a pH neutro). **(a)** Fórmula estructural en perspectiva: una cuña sólida (—) representa un enlace en el que el átomo del extremo más ancho se proyecta hacia el exterior del plano del papel y hacia el lector; la cuña a trazos (---) representa enlaces que están dirigidos hacia la parte posterior al plano del papel. **(b)** Modelo de bolas y varillas, donde se observan las longitudes relativas de los enlaces y los ángulos de enlace. **(c)** Modelo espacial, en el que cada átomo se presenta con su correspondiente radio de van der Waals.

La configuración es el resultado de la presencia de (1) enlaces dobles, alrededor de los cuales no existe libertad de rotación, o (2) centros quirales, alrededor de los cuales los grupos sustituyentes se disponen según una orientación específica. La característica que identifica a los estereoisómeros es que no pueden ser interconvertidos sin romper temporalmente uno o más enlaces covalentes. La **Figura 1–18a** muestra las configuraciones del ácido maleico y de su isómero, el ácido fumárico. Estos compuestos son **isómeros geométricos** o isómeros **cis-trans;** difieren en la disposición de sus grupos sustituyentes con respecto al doble enlace que no posee capacidad de rota-



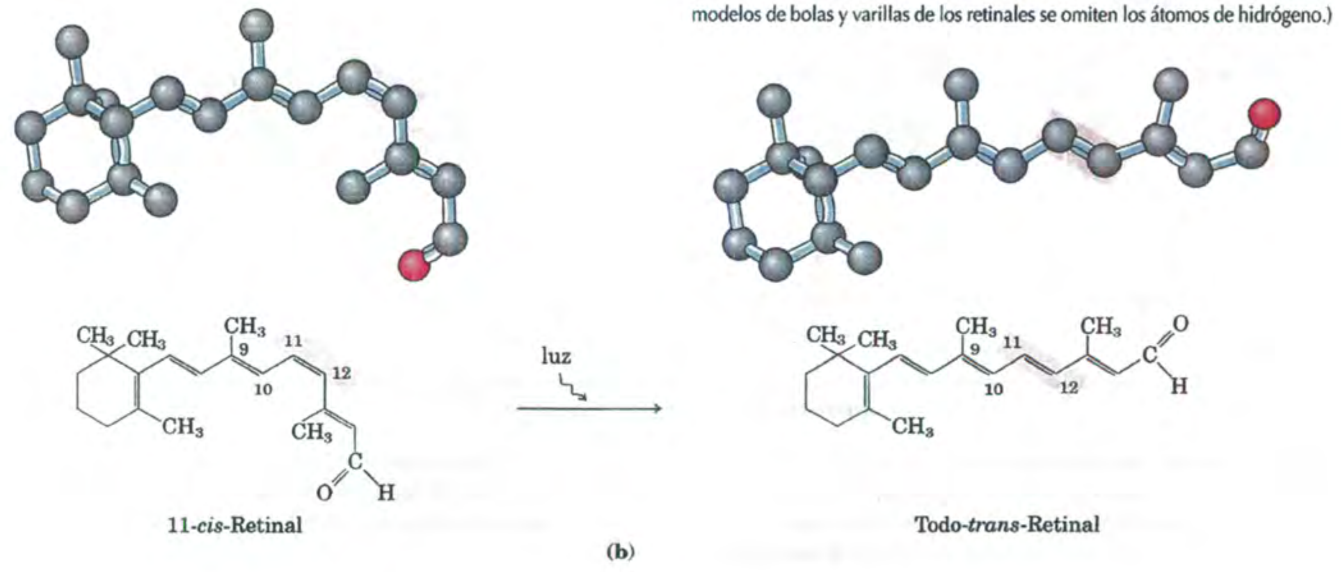


FIGURA 1–18 Configuraciones de isómeros geométricos. (a) Los isómeros tales como el ácido maleico (maleato a pH 7) y el ácido fumárico (fumarato) no pueden interconvertirse sin la rotura de enlaces covalentes, proceso que consume mucha más energía que la energía cinética media de moléculas a temperatura fisiológica. **(b)** En la retina de los vertebrados, el paso inicial del proceso de detección de la luz es la absorción de la luz visible por parte del 11-*cis*-retinal. La energía de la luz absorbida (aproximadamente 250 kJ/mol) convierte el 11-*cis*-retinal en todo-trans-retinal, lo que produce variaciones eléctricas en las células de la retina que dan lugar al impulso nervioso. (Obsérvese que en los modelos de bolas y varillas de los retinales se omiten los átomos de hidrógeno.)

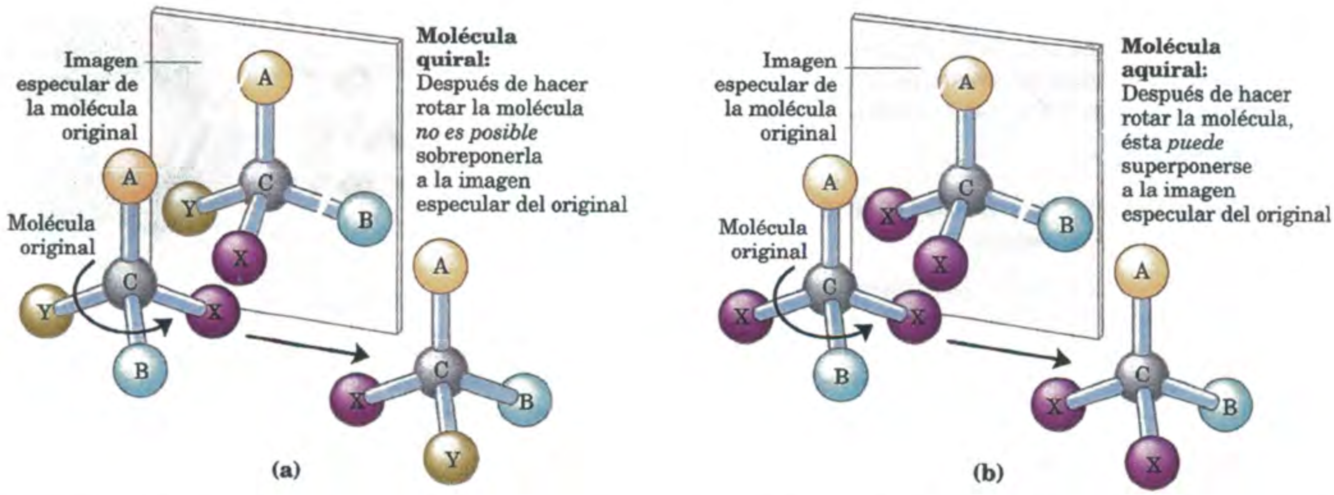


FIGURA 1–19 Asimetría molecular: moléculas quirales y aquirales. (a) Cuando un átomo de carbono tiene cuatro sustituyentes diferentes (A, B, X, Y), éstos pueden disponerse de dos maneras diferentes, que dan lugar a dos moléculas no superimponibles, siendo cada una de ellas la imagen especular de la otra (enantiómeros). Estos átomos de carbono asimétricos se denominan átomos quirales o centros quirales. (b) Cuando alrededor del átomo de carbono tetraédrico se disponen únicamente tres sustituyentes diferentes (es decir, hay dos sustituyentes iguales), solamente es posible una configuración espacial y la molécula es simétrica o aquiral. En este caso la molécula puede superponerse a su imagen especular: la molécula de la izquierda, rotando en sentido contrario a las agujas del reloj (cuando se mira hacia abajo por el eje vertical que une A y C), da lugar a la molécula del espejo.

ción (del latín *cis*, "a este lado", los grupos se encuentran en el mismo lado del enlace doble; *trans*, "al otro lado", los grupos se hallan en lados opuestos). El ácido maleico (maleato en el pH neutro del citoplasma) es el isómero cis y el ácido fumárico (fumarato) es el isómero trans; cada uno de ellos es un compuesto bien definido que puede ser aislado y purificado, teniendo cada uno de ellos sus propias características químicas. Un sitio de unión (por ejemplo, en un enzima) que sea complementario con una de estas moléculas no lo será para la otra, lo cual explica por qué estos compuestos tienen papeles biológicos diferentes a pesar de ser químicamente muy parecidos.

En el segundo tipo de estereoisomería, los cuatro sustituyentes diferentes unidos a un átomo de carbono tetraédrico pueden ordenarse en el espacio de dos maneras diferentes (es decir, tener dos configuraciones, **Fig. 1–19**), dando lugar a dos estereoisómeros con propiedades químicas similares o idénticas, pero que difieren en algunas propiedades físicas y biológicas. Se dice que un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes es asimétrico, y los carbonos asimétricos se denominan **centros quirales** (del griego *chiros*, "mano"; algunos estereoisómeros se relacionan entre sí como la mano izquierda con la derecha). Una molécula con un solo carbono quiral puede tener dos estereoisómeros, mientras que puede haber 2^n estereoisómeros cuando los carbonos quirales son dos o más (n). Los estereoisómeros que son imágenes especulares uno del otro se denominan **enantiómeros** (Fig. 1–19). Las parejas de estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan **diastereómeros (Fig. 1–20)**.

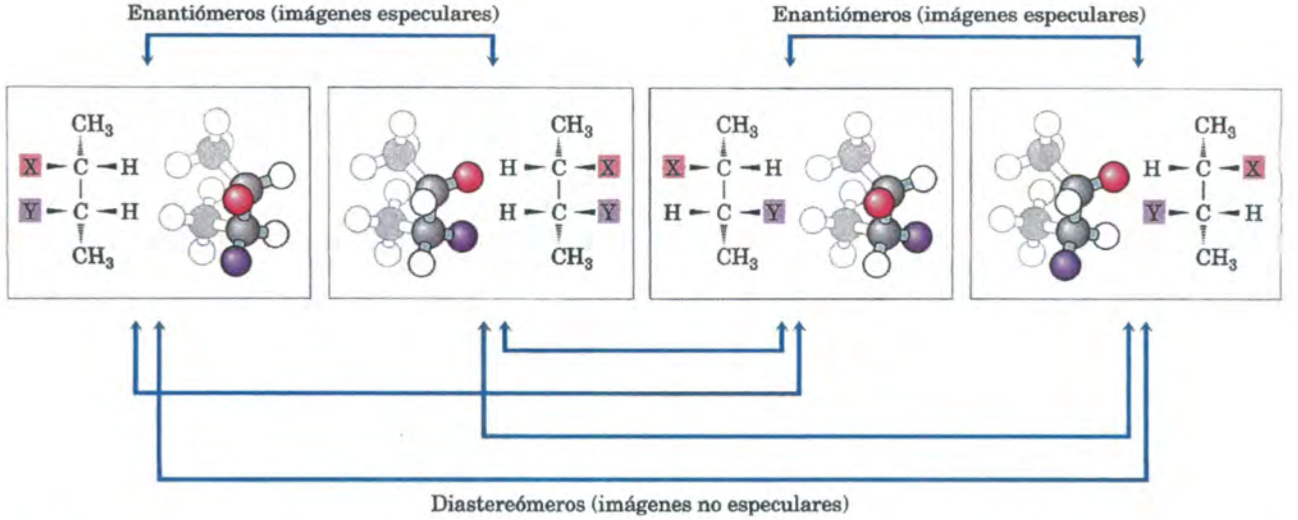


FIGURA 1–20 Dos tipos de estereoisómeros. Hay cuatro butanos diferentes 2,3-bisustituidos (n = 2 carbonos asimétricos, por lo tanto 2^n = 4 estereoisómeros). Cada uno de ellos se muestra en un recuadro como una fórmula en perspectiva y como un modelo de bolas y varillas, el cual se ha rotado para permitir que el lector vea todos los grupos. Dos pares de estereoisómeros son imágenes especulares uno del otro, siendo por tanto enantiómeros. Los otros pares no son imágenes especulares y reciben el nombre de diastereómeros.

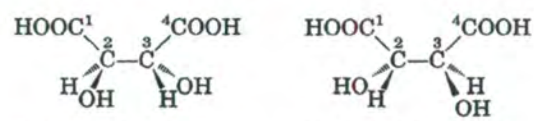
RECUADRO 1–2 Louis Pasteur y la actividad óptica: *in vino, veritas*

Louis Pasteur fue, en 1843, el primero en encontrar el fenómeno de la **actividad óptica.** Investigando sobre el material cristalino que se acumulaba en los barriles de vino (una forma del ácido tartárico denominada ácido paratartárico, también conocido como ácido racémico, del latín *racemus,* "racimo de uva"). Utilizó unas pinzas muy finas para separar dos tipos de cristales cuya forma era idéntica pero de los que cada uno de ellos era la imagen especular del otro. Ambos poseían todas las propiedades químicas del ácido tartárico pero, al disolverlos, uno de ellos hacía rotar el plano de la luz polarizada hacia la izquierda (levorrotatorio) y el otro hacia la derecha (dextrorrotatorio). Pasteur describió e interpretó el experimento de este modo:

Louis Pasteur
1822–1895

> En los cuerpos isoméricos, los elementos y las proporciones en las que se encuentran combinados son los mismos, tan sólo la disposición de los átomos es diferente... Sabemos, por un lado, que las disposiciones moleculares de los dos ácidos tartáricos son asimétricas y, por el otro, que estas disposiciones son absolutamente idénticas, a excepción de que exhiben asimetría en direcciones opuestas. ¿Se encuentran los átomos del ácido dextro agrupados en forma de una espiral dextrógira, situados en el vértice de un tetraedro irregular, o bien ordenados según ésta o aquella disposición asimétrica? No lo sabemos.*

Ahora podemos dar una respuesta. Los estudios cristalográficos con rayos X confirmaron en 1951 que las formas levorrotatoria y dextrorrotatoria del ácido tartárico son entre ellas imágenes especulares, y permitieron establecer la configuración absoluta de cada una de ellas (Fig. 1). Se ha utilizado la misma metodología para demostrar que, aunque el aminoácido alanina existe en dos formas estereoisoméricas (denominadas D y L), en las proteínas la alanina se presenta sólo en una de las formas (el isómero L; véase el capítulo 3).



Ácido (2*R*,3*R*)-tartárico (dextrorrotatorio) — Ácido (2*S*,3*S*)-tartárico (levorrotatorio)

FIGURA 1 Pasteur separó cristales de dos estereoisómeros del ácido tartárico y demostró que las disoluciones de los dos compuestos por separado daban lugar al mismo grado de rotación del plano de la luz polarizada pero en direcciones opuestas. Más tarde se demostró que las formas dextrorrotatoria y levorrotatoria de Pasteur correspondían a las formas isoméricas *(R,R)* y *(S,S)* aquí mostradas. En el texto se describe el sistema de nomenclatura RS.

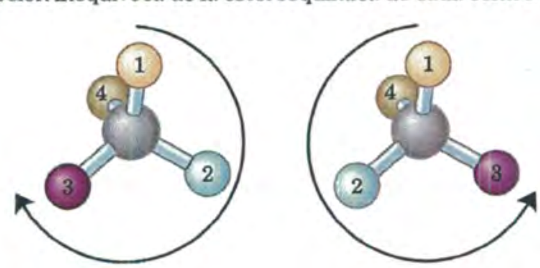
*Extraído de la conferencia de Pasteur en la Société Chimique de Paris en 1883, citada en DuBos, R. (1976) *Louis Pasteur: Free Lance of Science,* p. 95, Charles Scribner's Sons, New York.

Tal como observó Louis Pasteur en 1848 (Recuadro 1–2), los enantiómeros tienen propiedades químicas casi idénticas pero se diferencian en una propiedad física característica: su interacción con el plano de la luz polarizada. En disoluciones separadas, los dos enantiómeros rotan el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas, pero una disolución equimolar de los dos enantiómeros **(mezcla racémica)** no provoca rotación óptica. Los compuestos sin centros quirales no rotan la luz polarizada.

CONVENCIÓN CLAVE: Dada la importancia de la estereoquímica en las reacciones entre biomoléculas el bioquímico debe poder denominar y representar la estructura de las biomoléculas de modo que su estereoquímica quede definida sin ambigüedad. El sistema de nomenclatura RS es el más útil para compuestos con más de un centro quiral. En este sistema se asigna una *prioridad* a cada uno de los grupos unidos a un carbono quiral. La prioridad para algunos sustituyentes comunes es la siguiente:

$$-OCH_3 > -OH > -NH_2 > -COOH > -CHO > -CH_2OH > -CH_3 > -H$$

Según el sistema RS, el átomo quiral ha de mirarse de modo que el grupo de prioridad más baja (4 en el diagrama siguiente) quede situado en dirección opuesta al observador. Si la prioridad de los otros tres grupos (1 a 3) disminuye según el sentido de las agujas del reloj, la configuración será (*R*) (del latín *rectus*, "derecha") y si va en contra del sentido de las agujas del reloj, la configuración será (*S*) (del latín *sinister*, "izquierda"). De esta manera cada carbono quiral es llamado (*R*) o (*S*), y la presencia de esas designaciones en el nombre del compuesto da una descripción inequívoca de la estereoquímica de cada centro quiral.



Dextrógiro (*R*) — Levógiro (*S*)

En el Capítulo 3 se describe otro sistema de nomenclatura, el sistema D y L. Una molécula con un solo centro quiral (los dos isómeros del gliceraldehído, por ejemplo) puede nombrarse sin ambigüedad con cualquiera de los dos sistemas. ■

L-Gliceraldehído — (*S*)-Gliceraldehído

El concepto de **conformación** molecular, distinto del de configuración, describe la disposición espacial de los grupos sustituyentes que tienen libertad para adoptar posiciones diferentes en el espacio sin necesidad de romper enlaces, gracias a la libertad de rotación de los mismos. Por ejemplo, en el etano, un hidrocarburo sencillo, existe libertad casi total de rotación alrededor del enlace simple C—C. Por lo tanto, dependiendo del grado de rotación del enlace, son posibles muchas conformaciones diferentes e interconvertibles de la molécula de etano (**Fig. 1–21**). Dos de las conformaciones son de especial interés: la conformación extendida, que es más estable que las demás y es por tanto la conformación predominante, y la forma eclipsada, que es la menos estable. No es posible aislar ninguna de estas dos formas conformacionales puesto que son libremente interconvertibles. Sin embargo, cuando se reemplazan uno o más átomos de hidrógeno de cada uno de los carbonos con grupos funcionales voluminosos o cargados eléctricamente, la libertad de rotación alrededor del enlace C—C queda restringida, lo que limita el número de conformaciones estables de los derivados del etano.

Las interacciones entre las biomoléculas son estereoespecíficas

En las interacciones entre biomoléculas, el "encaje" debe ser estereoquímicamente correcto. La estructura tridimensional de las biomoléculas grandes y pequeñas, la combinación de su configuración y su conformación, es de primordial importancia en sus interacciones biológicas: un reactivo con su enzima, una hormona con su receptor de membrana celular, un antígeno con su anticuerpo específico son buenos ejemplos de ello (**Fig. 1–22**). El estudio de la estereoquímica biomolecular mediante métodos físicos precisos constituye una parte importante de la investigación moderna sobre estructura celular y función bioquímica.

Las moléculas quirales de los organismos vivos se encuentran generalmente presentes en sólo una de sus formas quirales. Por ejemplo, los aminoácidos están presentes en las proteínas sólo como isómeros L; la glucosa se encuentra presente tan sólo en forma de su isómero D. (En el Capítulo 3 se describen las convenciones para denominar los estereoisómeros de los aminoácidos; las correspondientes a los glúcidos se describen en el Capítulo 7; el sistema RS, descrito anteriormente, es el más útil para biomoléculas.) En cambio, cuando un compuesto que posee un átomo de carbono asimétrico se sintetiza químicamente en el laboratorio, la reacción suele producir todas las formas quirales posibles, dando lugar, por ejemplo, a una mezcla de formas D y L. En las células vivas se produce una sola forma quiral de una biomolécula gracias a que los enzimas que sintetizan esa molécula son también, a su vez, moléculas quirales.

La estereoespecificidad, o capacidad de distinguir entre estereoisómeros, es una propiedad de los enzimas y otras proteínas y un rasgo característico de la lógica molecular de las células vivas. Si el sitio de unión en una proteína es complementario para un isómero de un compuesto quiral, no será complementario para el otro, por la misma razón por la que un guante izquierdo no sirve para la mano derecha. En la **Figura 1–23** se muestran dos notables ejemplos de la capacidad de los sistemas biológicos para distinguir entre estereoisómeros.

Las clases comunes de reacciones químicas que se encuentran en la bioquímica se describen en el Capítulo 13, como introducción a las reacciones del metabolismo.

RESUMEN 1.2 Fundamentos químicos

- Gracias a su versatilidad de enlace, el átomo de carbono puede producir una amplia variedad de esqueletos carbono-carbono con diversidad de grupos funcionales; estos

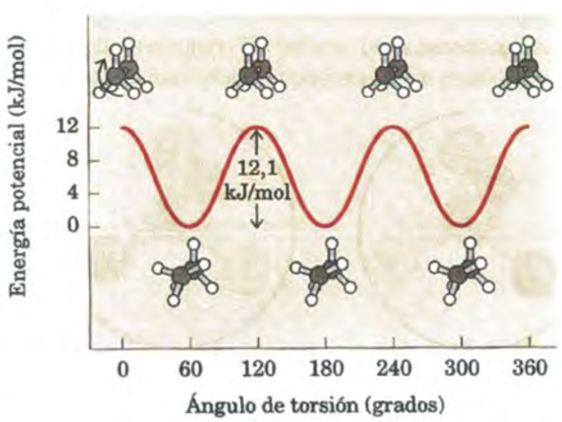


FIGURA 1–21 Conformaciones. El etano tiene muchas conformaciones posibles al existir libertad de rotación alrededor del enlace sencillo carbono-carbono. En el modelo de bolas y varillas, cuando el átomo de carbono anterior (desde el punto de vista del lector) y sus tres átomos de hidrógeno rotan con relación al átomo de carbono posterior, la energía potencial de la molécula aumenta hasta un máximo en la conformación completamente eclipsada (con ángulos de torsión de 0°, 120°, etc.), y disminuye hasta el mínimo en la conformación completamente extendida (ángulo de torsión de 60°, 180°, etc.). Las diferencias de energía son lo suficientemente pequeñas como para permitir la rápida interconversión de las dos formas (millones de veces por segundo), por lo que resulta imposible aislar separadamente las formas eclipsada y extendida.

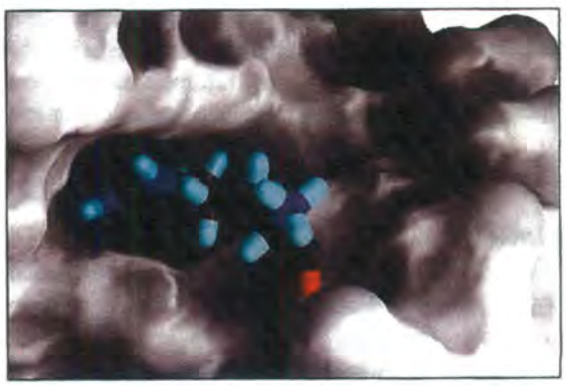


FIGURA 1–22 Encaje complementario de una macromolécula y una molécula pequeña. La figura muestra un segmento de RNA de una región reguladora conocida como TAR del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (en gris) unido a una molécula de argininamida (en color), que representan un residuo de una proteína que se une a esta región. La argininamida se ajusta a una cavidad de la superficie del RNA y se mantiene en esta orientación mediante varias interacciones no covalentes con él. Esta representación de la molécula de RNA está generada con programas informáticos que calculan la forma de la superficie externa de una macromolécula, ya sea en base a los radios de van der Waals de todos los átomos de la molécula o mediante el "volumen de exclusión del solvente", aquel más allá del cual no puede penetrar una molécula de agua.

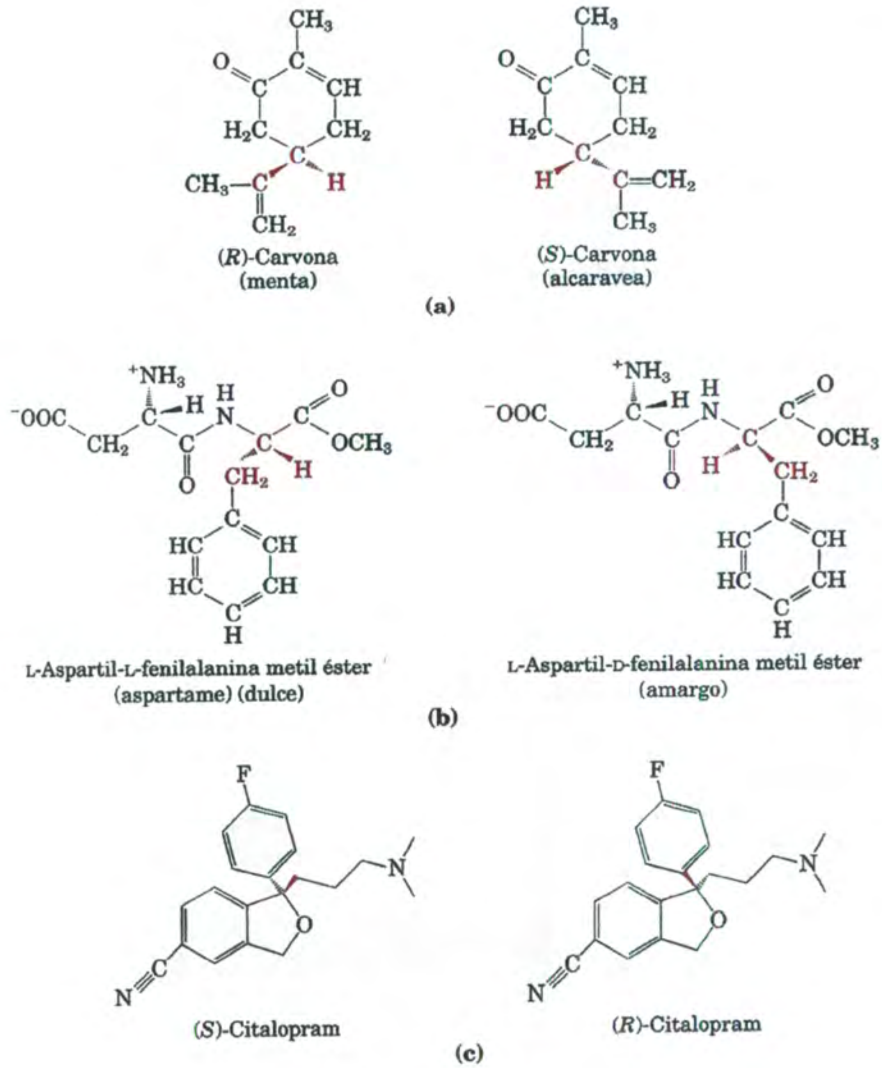


FIGURA 1–23 Los estereoisómeros tienen efectos diferentes sobre el ser humano. **(a)** Dos estereoisómeros de la carvona: la (*R*)-carvona (aislada del aceite de menta) posee la fragancia característica de la menta; la (*S*)-carvona (de aceite de semillas de alcaravea) huele a alcaravea. **(b)** El aspartame, el edulcorante comercializado con el nombre de NutraSweet, se distingue fácilmente de su estereoisómero amargo, a pesar de que ambos difieren tan sólo en la configuración de uno de los dos átomos de carbono quirales. **(c)** El medicamento antidepresivo citalopram (comercializado como Celexa), un inhibidor selectivo de la reabsorción de serotonina, es una mezcla racémica de los dos estereoisómeros pero tan sólo el (*S*)-citalopram tiene efecto terapéutico. El preparado esteroquímicamente puro de (*S*)-citalopram (oxalato de escitalopram) se comercializa bajo el nombre de Lexapro. Como es predecible, la dosis efectiva de Lexapro es la mitad de la dosis efectiva de Celexa.

grupos son los que confieren a las biomoléculas su personalidad biológica y química.

- Las células vivas contienen un conjunto casi universal de unos centenares de moléculas de baja masa molecular; las interconversiones de estas moléculas en las rutas metabólicas centrales se han conservado a lo largo de la evolución.
- Las proteínas y los ácidos nucleicos son polímeros lineales de subunidades monoméricas simples; sus secuencias contienen la información necesaria para definir su estructura tridimensional y sus funciones biológicas.
- La única manera de cambiar la configuración molecular es mediante la rotura de enlaces covalentes. Si un átomo de carbono tiene cuatro sustituyentes diferentes (un carbono quiral), éstos pueden ordenarse de dos modos diferentes, generando estereoisómeros con propiedades diferentes. Sólo uno de los estereoisómeros es biológicamente activo. La conformación molecular es la posición de los átomos en el espacio que puede cambiar por rotación alrededor de enlaces simples, sin que implique la rotura de enlaces covalentes.
- De modo prácticamente invariable, las interacciones entre moléculas biológicas son estereoespecíficas: requieren el encaje complementario específico entre las moléculas que interactúan.

1.3 Fundamentos físicos

Las células y organismos vivos deben producir trabajo para mantenerse vivas y reproducirse. Las reacciones sintéticas celulares requieren aporte de energía del mismo modo que los procesos sintéticos industriales. También se consume energía en el movimiento de una bacteria o en el de un esprínter olímpico, en el destello de una luciérnaga o en la descarga eléctrica de una anguila. Además, el almacenaje y la expresión de la información tienen un coste energético, sin el cual las estructuras ricas en información perderían inevitablemente su orden y, por ende, su significado.

Las células han desarrollado, a lo largo de la evolución, mecanismos muy eficientes para el acoplamiento de la energía obtenida de la luz solar o de los combustibles con muchos procesos celulares que consumen energía. Uno de los objetivos de la bioquímica es la comprensión, en términos químicos y cuantitativos, de los mecanismos de extracción, canalización y consumo de la energía en las células vivas. Al igual que con otras conversiones energéti-

cas, podemos considerar las conversiones de la energía celular en el contexto de las leyes de la termodinámica.

Los organismos vivos existen en un estado estacionario dinámico y no se hallan nunca en equilibrio con su entorno

Las moléculas e iones contenidos en un organismo vivo difieren en cuanto a tipo y concentración de los que se encuentran en su entorno. Un paramecio en una charca, un pez en el océano, una bacteria del suelo o un peral en un jardín son ejemplos de organismos con una composición diferente a la de su entorno y que una vez han llegado a su madurez mantienen una composición más o menos constante a pesar de que su entorno cambie constantemente.

A pesar de que la composición química característica de un organismo varía poco a lo largo del tiempo, la población de moléculas de una célula u organismo se encuentra bien lejos de ser estática. Continuamente se sintetizan y se degradan pequeñas moléculas, macromoléculas y complejos supramoleculares mediante reacciones químicas que necesitan del constante flujo de masa y energía a través del sistema. Las moléculas de hemoglobina que están transportando en este momento oxígeno desde sus pulmones a su cerebro se sintetizaron el mes pasado; dentro de un mes se habrán degradado y habrán sido reemplazadas completamente por nuevas moléculas de hemoglobina. La glucosa que ingirió en la última comida se encuentra ahora circulando por su torrente sanguíneo; antes de que termine el día estas mismas moléculas de glucosa se habrán convertido en otra cosa, quizá dióxido de carbono o grasa, y habrán sido reemplazadas por un aporte fresco de glucosa, de modo que su concentración de glucosa en sangre se mantenga más o menos constante a lo largo del día. La cantidad de hemoglobina y glucosa en sangre permanece prácticamente constante porque la velocidad de síntesis o ingestión de cada una de ellas compensa con exactitud la velocidad de su degradación, consumo o conversión en algún otro producto. La constancia en la concentración es el resultado de un *estado estacionario dinámico*, un estado estacionario que se encuentra lejos del equilibrio. El mantenimiento de este estado estacionario requiere del aporte constante de energía; cuando la célula ya no es capaz de generar energía, muere e inicia su degradación hacia el equilibrio con su entorno. A continuación veremos qué es lo que se conoce exactamente como "estado estacionario" y "equilibrio".

Los organismos transforman energía y materia de su entorno

Para las reacciones químicas que tienen lugar en solución, podemos definir un **sistema** como el conjunto de los reactivos y productos presentes, el disolvente que los contiene y la atmósfera circundante o, dicho de otro modo, todo aquello que está incluido en una región definida del espacio. El conjunto del sistema y sus entornos configuran el **universo.** Si el sistema no intercambia materia ni energía con su entorno, se denomina **aislado.** Si intercambia energía pero no materia con su entorno es un sistema **cerrado;** si intercambia materia y energía, es un sistema **abierto.**

Un organismo vivo es un sistema abierto que intercambia materia y energía con su entorno. Los organismos vivos extraen energía de su entorno de dos maneras: (1) captan combustibles químicos (como por ejemplo glucosa) del entorno y extraen energía de su oxidación (véase el Recuadro 1–3, Caso 2); o (2) absorben energía de la radiación solar.

La primera ley de la termodinámica describe el principio de conservación de la energía: *en cualquier proceso físico o químico la cantidad de energía total del universo permanece constante, aunque su forma puede variar*. Las células son transductores consumados de energía, capaces de interconvertir energía química, electromagnética, mecánica y osmótica con gran eficiencia **(Fig. 1–24)**.

El flujo de electrones da energía para los organismos

Prácticamente todos los organismos vivos derivan su energía, directa o indirectamente, de la energía radiante de la luz solar.

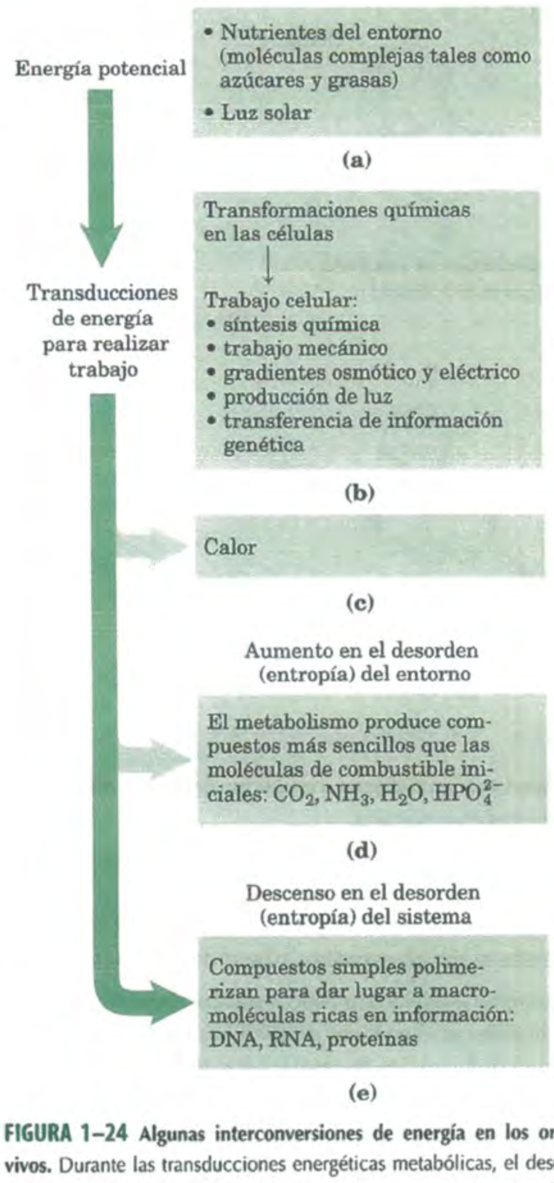


FIGURA 1–24 Algunas interconversiones de energía en los organismos vivos. Durante las transducciones energéticas metabólicas, el desorden del sistema y de su entorno (expresado cuantitativamente como entropía) aumenta a la vez que la energía potencial de las moléculas nutrientes complejas disminuye. **(a)** Los organismos vivos extraen energía de su entorno, **(b)** convierten parte de ella en formas útiles para producir trabajo, **(c)** devuelven parte de la energía al entorno en forma de calor y **(d)** liberan moléculas como productos finales menos organizadas que el combustible original, aumentando la entropía del universo. Como consecuencia de todas estas transformaciones **(e)** aumenta el orden (disminuye el desorden) en el sistema mediante la formación de macromoléculas complejas. En el Capítulo 13 se presenta un tratamiento cuantitativo de la entropía.

RECUADRO 1-3 Entropía: las ventajas de estar desorganizado

El término "entropía", que literalmente significa "cambio en el interior", fue utilizado por primera vez en 1851 por Rudolf Clausius, uno de los autores que formularon la segunda ley de la termodinámica. La definición cuantitativa rigurosa de la entropía implica consideraciones estadísticas y probabilísticas. No obstante, se puede ilustrar su naturaleza de forma cualitativa con tres ejemplos sencillos, cada uno de los cuales muestra un aspecto de la entropía. Los rasgos clave que describen la entropía son *azar* y *desorden*, que se manifiestan en formas diversas.

Caso 1: La tetera y la distribución aleatoria del calor

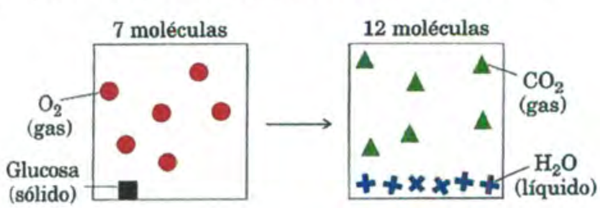
Sabemos que el vapor que se genera a partir del agua hirviente puede realizar trabajo útil. Pero supongamos que apagamos el fogón debajo de una tetera llena de agua a 100 °C (el "sistema") en la cocina (el "entorno") y la dejamos enfriar. A medida que se enfría, no se produce trabajo, pero el calor pasará de la tetera al entorno, elevando la temperatura del entorno (la cocina) en una cantidad infinitesimalmente pequeña hasta alcanzar el equilibrio completo. En este momento todas las partes de la tetera y de la cocina estarán exactamente a la misma temperatura. La energía libre que en un momento estaba concentrada en la tetera de agua caliente a 100 °C, *potencialmente* capaz de realizar trabajo, ha desaparecido. Su equivalente en energía calórica está aún presente en la tetera + cocina, es decir, el "universo", pero se ha distribuido por completo aleatoriamente en todo el mismo. Esta energía ya no sirve para realizar trabajo porque no hay diferencial de temperatura dentro de la cocina. Además, el aumento de entropía de la cocina (el entorno) es irreversible. Sabemos de la experiencia diaria que el calor nunca vuelve atrás espontáneamente desde la cocina a la tetera para volver a elevar la temperatura del agua a 100 °C.

Caso 2: Oxidación de la glucosa

La entropía es un estado no sólo de la energía sino también de la materia. Los organismos aeróbicos (heterótrofos) extraen energía libre de la glucosa obtenida de su entorno a través de la oxidación de la glucosa con O_2, también obtenido del entorno. Los productos finales de este metabolismo oxidativo, CO_2 y H_2O, son devueltos al entorno. En este proceso el entorno experimenta un incremento de entropía, mientras que el propio organismo permanece en estado estacionario y no experimenta ningún cambio en su orden interno. Aunque parte de la entropía surge de la disipación de calor, la entropía también proviene de otro tipo de desorden, ilustrado por la ecuación de la oxidación de la glucosa:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

que podemos representar de manera esquemática como



Los átomos contenidos en una molécula de glucosa más 6 moléculas de oxígeno, un total de 7 moléculas, ahora se dispersan más al azar a causa de la reacción de oxidación y están ahora presentes en un total de 12 moléculas ($6CO_2 + 6H_2O$).

Siempre que una reacción química produce un aumento en el número de moléculas, o cuando una sustancia sólida se convierte en productos gaseosos o líquidos, que permiten más libertad para el movimiento molecular que un sólido, hay un incremento en el desorden molecular y, por tanto, de la entropía.

Caso 3: Información y entropía

El siguiente fragmento de *Julio César*, Acto IV, Escena 3, es declamado por Bruto. Es un ordenamiento no al azar y rico en información de 125 letras del alfabeto inglés:

> There is a tide in the affairs of men,
> Which, taken at the flood, leads on to fortune;
> Omitted, all the voyage of their life
> Is bound in shallows and in miseries.*

Esta cita, además de reflejar una compleja serie de hechos en la obra, también se hace eco de las ideas desarrolladas en el drama sobre el conflicto, la ambición y las exigencias del liderazgo. Asentada en los conocimientos de Shakespeare sobre la naturaleza humana, es muy rica en información.

No obstante, si se permitiera que las 125 letras que forman esta cita se distribuyeran totalmente al azar, de modo caótico, como se muestra en el cuadro, no tendrían ningún significado.

Puestas así, las 125 letras no contendrían ninguna información, pero serían muy ricas en entropía. Tales consideraciones han llevado a la conclusión de que la información es una forma de energía y se la ha denominado "entropía negativa". De hecho, la rama de las matemáticas denominada teoría de la información, que es básica para la lógica de programación de los ordenadores, está relacionada con la teoría termodinámica. Los organismos vivos son estructuras muy ordenadas, no al azar, que son inmensamente ricos en información y pobres en entropía.

* En los negocios humanos hay una marea que,
aprovechada en la pleamar, conduce a la fortuna;
pero si no se aprovecha, todo el viaje de la vida
va en medio de bajíos y naufragios.
SHAKESPEARE, *Dramas*, Editorial Iberia, S.A., Barcelona

La descomposición del agua a cargo de la energía de la luz que se produce durante la fotosíntesis libera electrones para la reducción del CO_2 y la liberación de O_2 a la atmósfera:

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{luz}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

(reducción del CO_2 por acción de la energía de la luz)

La células y los organismos no fotosintéticos obtienen energía para sus necesidades mediante la oxidación de los productos ricos en energía de la fotosíntesis, transportando los electrones así adquiridos hacia el O_2 atmosférico para formar agua, CO_2 y otros productos finales, que son reciclados en el medio ambiente:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energía}$$

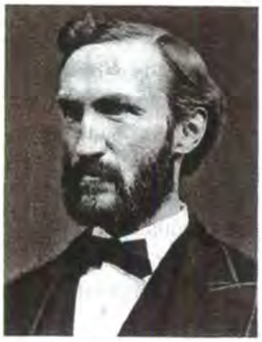
(reacción de oxidación de la glucosa que produce energía)

De este modo, los autótrofos y los heterótrofos participan en los ciclos globales del O_2 y del CO_2 gobernados en última instancia por la luz solar, lo que convierte a estos dos grandes grupos de organismos en interdependientes. Prácticamente todas las transducciones energéticas de las células pueden entenderse como un flujo de electrones desde una molécula a otra, en un proceso "cuesta abajo" desde potenciales electroquímicos superiores a inferiores; siendo así, esto es formalmente análogo al flujo de electrones en un circuito eléctrico alimentado por una batería eléctrica. Todas las reacciones que implican un flujo de electrones son **reacciones de oxidación-reducción:** un reactivo se oxida (pierde electrones) y otro se reduce (gana electrones).

Crear y mantener el orden requiere trabajo y energía

Como ya hemos visto, el DNA, el RNA y las proteínas son macromoléculas informativas; la secuencia precisa de sus subunidades monoméricas contiene información de la misma manera que la contienen las letras de esta frase. Además de usar energía química para formar los enlaces covalentes entre estas subunidades, las células deben invertir energía para ordenar las subunidades en su secuencia correcta. Es extremadamente improbable que los aminoácidos de una mezcla se condensen espontáneamente para formar un solo tipo de proteína de secuencia única. Ello implicaría un aumento del orden en una población de moléculas, lo que contrastaría con la segunda ley de la termodinámica según la cual la tendencia de cualquier proceso natural es la de incrementar el desorden del universo: *la entropía total del universo está en crecimiento constante*. Para dar lugar a la síntesis de macromoléculas a partir de sus subunidades monoméricas debe suministrarse energía libre al sistema (la célula en este caso).

CONVENCIÓN CLAVE: El desorden de los componentes de un sistema químico se expresa como **entropía, *S*** (Recuadro 1–3). Cualquier variación en el grado de desorden de un sistema equivale a una variación de entropía, ΔS, que, convencionalmente, adopta valores positivos cuando aumenta el desorden. J. Willard Gibbs, que desarrolló la teoría de las variaciones energéticas durante las reacciones químicas, demostró que el **contenido en energía libre, *G*,** de cualquier sistema cerrado puede definirse en base a tres magnitudes: **entalpía, *H*,** que refleja el número y el tipo de enlaces; entropía, S; y la temperatura absoluta, T (en grados Kelvin). La definición de energía libre es: $G = H - TS$. Si una reacción química tiene lugar a temperatura constante, la **variación de energía libre, ΔG,** viene determinada por la variación de entalpía ΔH, que refleja el tipo y la cantidad de enlaces químicos e interacciones no covalentes que se rompen y se forman, y la variación de entropía, ΔS, que describe el cambio en el grado de desorden del sistema:



J. Willard Gibbs, 1839–1903

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

donde, por definición, ΔH es negativa para una reacción que libera calor y ΔS es positiva para una reacción que incrementa el desorden del sistema. ■

Un proceso tiende a ocurrir espontáneamente sólo si ΔG es negativa (si se *libera* energía libre durante el proceso). Sin embargo, la función celular depende principalmente en moléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos, para las que la energía libre de formación es positiva: son moléculas menos estables y más ordenadas que una mezcla de sus componentes monoméricos. Para llevar a cabo estas reacciones termodinámicamente desfavorables que requieren energía (reacciones **endergónicas**), la célula las acopla a otras que desprenden energía libre (reacciones **exergónicas**), de modo que el proceso sea globalmente exergónico: la *suma* de las variaciones de energía libre es negativa.

La fuente habitual de energía libre en las reacciones biológicas acopladas es la energía liberada por la rotura de enlaces fosfoanhídrido tales como los que se encuentran en la adenosina trifosfato (ATP; **Fig. 1–25**) y la guanosina trifosfato (GTP). En la figura siguiente cada Ⓟ representa un grupo fosforilo:

Aminoácidos → proteína — **ΔG_1 es positiva (endergónica)**
ATP → AMP + Ⓟ–Ⓟ — **ΔG_2 es negativa (exergónica)**
[o ATP → ADP + Ⓟ]

Cuando estas reacciones están acopladas, la suma de ΔG_1 y ΔG_2 es negativa (el proceso global es exergónico). Mediante esta estrategia, la célula puede sintetizar y mantener los polímeros ricos en información esenciales para la vida.

El acoplamiento energético conecta las reacciones biológicas

La cuestión central de la *bioenergética* (el estudio de las transformaciones energéticas en los seres vivos) es el modo por el cual la energía obtenida de la luz o del metabolismo de los combustibles se acopla a las reacciones celulares que requieren energía. Para comprender el acoplamiento de la energía es instructivo considerar un ejemplo mecánico simple tal como el mostrado en la **Figura 1–26a**. Un objeto situado en la parte superior de un plano inclinado posee una cierta cantidad de ener-

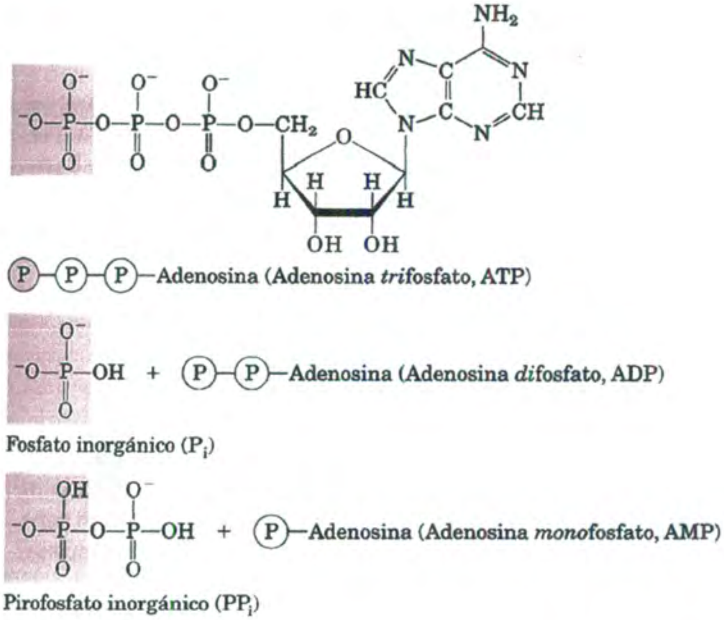


FIGURA 1–25 El trifosfato de adenosina (ATP) proporciona energía. Aquí, cada Ⓟ representa un grupo fosforilo. La eliminación del grupo fosforilo terminal del ATP (sombreado en rosa) mediante rotura de un enlace fosfoanhídrido, que genera adenosina difosfato (ADP) y el ión fosfato inorgánico (HPO_4^{2-}), es altamente exergónica y se acopla a muchas reacciones endergónicas en la célula (como en el ejemplo de la Figura 1–26b). El ATP también proporciona energía para muchos procesos celulares mediante la rotura que libera dos grupos fosfato terminales en forma de pirofosfato inorgánico ($H_2P_2O_7^{2-}$), a menudo abreviado como PP_i.

gía potencial como resultado de su elevación. Tiende a deslizarse por el plano, perdiendo progresivamente su energía potencial al acercarse al suelo. Si al objeto deslizante se le acopla, mediante un mecanismo de cuerda y polea, un objeto mas pequeño, el movimiento espontáneo hacia abajo del más grande puede hacer elevar al más pequeño, realizándose una cierta cantidad de trabajo. La cantidad de energía transformable en trabajo es **variación de energía libre, ΔG;** este valor será siempre ligeramente inferior a la cantidad teórica de energía liberada, habida cuenta de que una parte de la energía se disipa en forma de calor de fricción. Cuanto mayor sea la elevación del objeto más grande, mayor será el cambio energético al deslizarse hacia abajo (ΔG) y mayor será la cantidad de trabajo que pueda realizar. El objeto más grande puede elevar al más pequeño sólo porque, en el inicio, el objeto mayor se hallaba *lejos de su posición de equilibrio*: en algún momento anterior había sido elevado por encima del suelo mediante un proceso que también consumió energía.

¿Cuál es el equivalente de este proceso en reacciones químicas? En sistemas cerrados, las reacciones químicas se producen espontáneamente hasta que se alcanza el **equilibrio.** Cuando el sistema está en equilibrio, la velocidad de formación de producto es exactamente igual a la velocidad en que el producto se convierte en reactivo. Así no hay un cambio neto en la concentración de reactivos y productos. La variación de energía que se produce cuando el sistema evoluciona desde su estado inicial al de equilibrio, sin variaciones en la presión y la temperatura, viene dada por la variación de energía libre, ΔG. La magnitud de ΔG depende de la reacción química en particular *y de lo lejos que el sistema se encuentre inicialmente del equilibrio*. Cada uno de los compuestos implicados en una reacción química contiene una

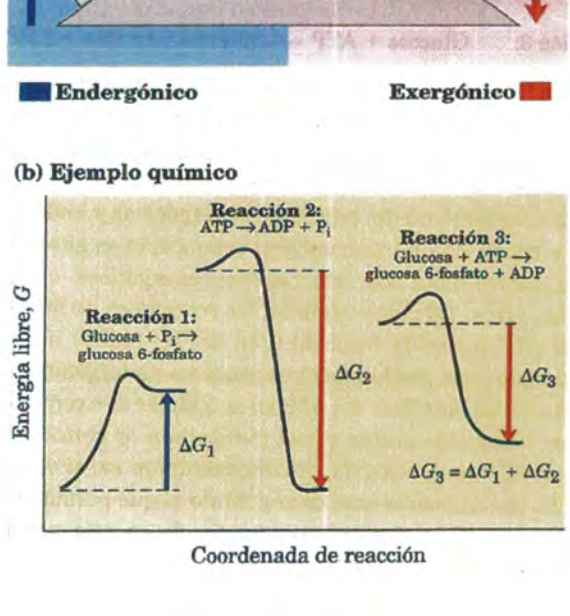


FIGURA 1–26 Acoplamiento energético en procesos químicos y mecánicos. **(a)** El movimiento descendente de un objeto libera energía potencial capaz de producir trabajo. La energía potencial liberada por el movimiento descendente espontáneo, un proceso exergónico (rosa), puede acoplarse al movimiento endergónico ascendente de otro objeto (azul). **(b)** En la reacción 1 la formación de glucosa 6-fosfato a partir de glucosa y fosfato inorgánico (P_i), da lugar a un producto con una energía superior a la de los dos reactivos. La ΔG es positiva para esta reacción endergónica. En la reacción 2, la rotura exergónica de la adenosina trifosfato (ATP) tiene una variación de energía libre grande y negativa (ΔG_2). La tercera reacción representa la suma de las reacciones 1 y 2, y la variación en su energía libre ΔG_3 es la suma aritmética de ΔG_1 y ΔG_2. Puesto que el valor de ΔG_3 es negativo, la reacción global es exergónica y se da espontáneamente.

cierta cantidad de energía potencial, que guarda relación con el número y el tipo de enlaces.

En las reacciones que ocurren espontáneamente, los productos tienen menos energía libre que los reactivos, de manera que la reacción libera una cantidad de energía libre que está disponible para realizar trabajo. Estas reacciones se denominan exergónicas y la disminución de energía libre de reactivos a productos se expresa con un valor negativo. Las reacciones endergónicas, en cambio, requieren un aporte de energía, y sus valores de ΔG son positivos. Al igual que en los procesos mecánicos, solamente una parte de la energía liberada en las reacciones químicas exergónicas se puede utilizar para producir trabajo. En los sistemas vivos parte de la energía se disipa en forma de calor o se pierde incrementando la entropía.

En los organismos vivos, del mismo modo que ocurre en el ejemplo mecánico de la figura 1–26a, una reacción exergónica se puede acoplar a una reacción endergónica para hacer posibles ciertas reacciones que de otro modo serían desfavorables. La figura 1–26b (un tipo de gráfico denominado diagrama de coordenada de reacción) ilustra este principio para el caso de la conversión de glucosa en glucosa 6-fosfato, el primer paso en la ruta de la oxidación de glucosa. El camino más simple para producir glucosa 6-fosfato sería:

Reacción 1: Glucosa + $P_i \longrightarrow$ glucosa 6-fosfato
(endergónica; ΔG_1 es positiva)

(Aquí, P_i es la abreviatura para el fosfato inorgánico HPO_4^{2-}. No describiremos ahora en detalle, sino más adelante, la estructura de estos compuestos.) Esta reacción no ocurre espontáneamente porque ΔG_1 es positiva. Una segunda reacción muy exergónica puede tener lugar en todas las células:

Reacción 2: ATP $\longrightarrow$ ADP + P_i
(exergónica; ΔG_2 es negativa)

Estas dos reacciones comparten un intermediario común, P_i, que se consume en la reacción 1 y se produce en la reacción 2. Las dos reacciones pueden, por tanto, acoplarse en la forma de una tercera reacción que se puede escribir como la suma de las reacciones 1 y 2, omitiendo el intermediario común, P_i, de los dos lados de la ecuación:

Reacción 3: Glucosa + ATP $\longrightarrow$ glucosa 6-fosfato + ADP

Puesto que se libera más energía en la reacción 2 que la consumida en la reacción 1, la variación de energía libre en la reacción 3, ΔG_3, es negativa, lo que hace posible que la síntesis de glucosa 6-fosfato transcurra a través de la reacción 3.

El acoplamiento de reacciones exergónicas y endergónicas a través de un intermediario compartido es absolutamente básico para los intercambios energéticos en los sistemas vivos. Tal como veremos, las reacciones de hidrólisis del ATP (como la reacción 2 en la Fig. 1–26b) liberan energía que hace posible muchos procesos endergónicos en las células. La hidrólisis del ATP en las células es exergónica porque *todas las células vivas mantienen la concentración de ATP muy lejos de su concentración en el equilibrio*. Es precisamente este desequilibrio el que permite que el ATP sirva como el principal portador de energía química en las células.

K_{eq} y $\Delta G°$ miden la tendencia de una reacción a transcurrir espontáneamente

La tendencia de una reacción química a llegar a su final puede expresarse en forma de una constante de equilibrio. Para la reacción en la que *a* moles de A reaccionan con *b* moles de B para dar *c* moles de C y *d* moles de D,

$$aA + bB \longrightarrow cC + dD$$

la constante de equilibrio, K_{eq}, viene dada por

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}^c\,[D]_{eq}^d}{[A]_{eq}^a\,[B]_{eq}^b}$$

donde $[A]_{eq}$ es la concentración de A, $[B]_{eq}$ es la concentración de B y así sucesivamente, *cuando el sistema ha llegado al equilibrio*. Un valor elevado de K_{eq} indica que la reacción tiene lugar hasta que los reactivos se han convertido casi completamente en productos.

Gibbs demostró que la ΔG (el cambio de energía libre real) de una reacción química cualquiera es función de la **variación de energía libre estándar, $\Delta G°$** (una constante característica de cada reacción específica) y de un término que expresa la concentración inicial de reactivos y productos:

$$\Delta G = \Delta G° + RT\ln\frac{[C]_i^c\,[D]_i^d}{[A]_i^a\,[B]_i^b} \qquad (1\text{–}1)$$

donde $[A]_i$ es la concentración inicial de A y así sucesivamente, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta.

ΔG es una medida de la distancia de un sistema a su posición de equilibrio. Cuando una reacción ha alcanzado el equilibrio no persiste ninguna fuerza que la induzca a ir en una dirección u otra y no puede realizar trabajo: $\Delta G = 0$. En esta situación concreta, $[A]_i = [A]_{eq}$, y así sucesivamente para todos los reactivos y productos, de modo que:

$$\frac{[C]_i^c\,[D]_i^d}{[A]_i^a\,[B]_i^b} = \frac{[C]_{eq}^c\,[D]_{eq}^d}{[A]_{eq}^a\,[B]_{eq}^b}$$

Sustituyendo ΔG por 0 y $[C]_i^c\,[D]_i^d/[A]_i^a\,[B]_i^b$ por K_{eq} en la Ecuación 1–1, obtenemos la relación

$$\Delta G° = -RT\ln K_{eq}$$

de la que deducimos que $\Delta G°$ es tan sólo una manera alternativa a K_{eq} para expresar la dirección de una reacción. Gracias a que K_{eq} se puede medir experimentalmente, disponemos de un modo de determinar $\Delta G°$, la constante termodinámica característica de cada reacción.

$\Delta G°$ y ΔG se expresan en joules por mol (o calorías por mol). Si $K_{eq} >> 1$, $\Delta G°$ es grande y negativa; si $K_{eq} << 1$, $\Delta G°$ es grande y positiva. Es posible deducir con un simple vistazo a una tabla de valores de K_{eq} o de $\Delta G°$ cuáles son las reacciones que tenderán a producirse y cuáles no.

Hay que tomar una precaución en cuanto a la interpretación de $\Delta G°$: las constantes *termodinámicas* tales como ésta muestran dónde se halla el punto de equilibrio final de la reacción, pero nada nos dicen acerca de la velocidad con que se alcanza. La velocidad de las reacciones viene gobernada por los

parámetros *cinéticos*, un tema que consideraremos en el Capítulo 6.

Los enzimas facilitan las secuencias de reacciones químicas

Todas las macromoléculas biológicas son mucho más inestables termodinámicamente que sus subunidades monoméricas, aunque sean, no obstante, *estables cinéticamente*: su degradación *no catalizada* ocurre tan lentamente (en un margen de años y no de segundos) que, en la escala de tiempo aplicable a los organismos, estas moléculas son estables. Si prácticamente todas las reacciones químicas celulares tienen lugar a una velocidad significativa es gracias a la presencia de **enzimas:** biocatalizadores que, al igual que el resto de catalizadores, provocan un gran incremento en la velocidad de reacciones químicas específicas sin consumirse en el proceso.

La trayectoria desde reactivo(s) a producto(s) transcurre de manera prácticamente invariable a través de una barrera energética, denominada barrera de activación **(Fig. 1–27)**, que debe ser superada para que tenga lugar la reacción. La rotura y formación de enlaces implica generalmente y de manera previa la distorsión de los enlaces existentes, lo que genera un **estado de transición** de mayor energía libre que reactivos o productos. El punto más alto en un diagrama de coordenadas de reacción representa el estado de transición y la diferencia de energía entre un reactivo en su estado fundamental y en su estado de transición se denomina **energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$.** Los enzimas catalizan reacciones proporcionando un entorno más confortable para el estado de transición: una superficie complementaria en su estereoquímica, polaridad o carga. La unión de un enzima al estado de transición es exergónica, y la energía liberada por esa unión reduce la energía de activación de la reacción, incrementando de modo muy importante su velocidad.

Una contribución adicional a la catálisis ocurre cuando dos o más reactivos se unen a la superficie del enzima en lugares cercanos y en una orientación estereoespecífica que favorece la reacción. Gracias a esta disposición se incrementa en varios órdenes de magnitud la probabilidad de que se produzcan colisiones productivas entre los reactivos. Como resultado de estos y otros factores que se discuten en el Capítulo 6, las reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar generalmente a velocidades superiores a 10^{12} veces las de las reacciones no catalizadas. (Esto equivale a *¡un millón de millones de veces más rápidas!*)

Salvo algunas excepciones, los catalizadores celulares son proteínas. (Como se discutirá en los Capítulos 26 y 27, las moléculas de RNA desempeñan en ocasiones papeles catalíticos.) También de modo casi universal, cada enzima cataliza una reacción específica, y cada reacción en la célula está catalizada por un enzima diferente. Es por tanto evidente que en cada célula son necesarios miles de enzimas diferentes. La multiplicidad de los enzimas, su especificidad (la capacidad de discriminar entre diferentes reactivos) y su susceptibilidad a la regulación confieren a las células la capacidad de disminuir selectivamente las barreras de activación. Esta selectividad resulta crucial para la regulación efectiva de los procesos celulares. Haciendo que las reacciones específicas procedan a velocidades significativas, los enzimas determinan de qué modo se canalizan la materia y la energía en las actividades celulares.

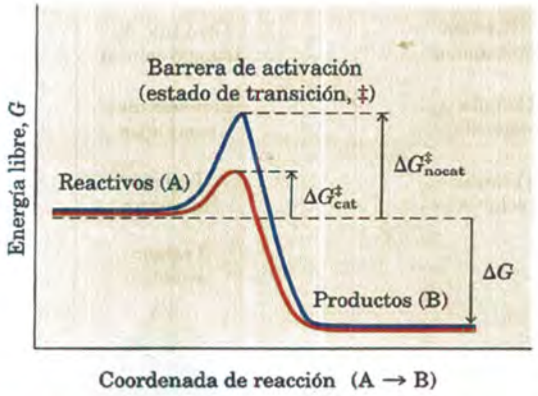


FIGURA 1–27 Cambios energéticos durante una reacción química. En el proceso de conversión de los reactivos (A) en productos (B) debe salvarse una barrera de activación que representa el estado de transición (véase el Capítulo 6), a pesar de que los productos sean más estables que los reactivos, tal como indica la gran variación negativa de energía libre (ΔG). La energía necesaria para superar la barrera de activación es la energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$). Los enzimas catalizan las reacciones disminuyendo la barrera de activación. Se unen fuertemente a los intermedios del estado de transición, y la energía de enlace de esta interacción hace que la energía de activación se reduzca de modo efectivo desde $\Delta G^{\ddagger}_{nocat}$ (curva azul) hasta $\Delta G^{\ddagger}_{cat}$ (curva roja). (Obsérvese que la energía de activación no está relacionada con la variación de la energía libre de la reacción, ΔG.)

Los miles de reacciones químicas catalizadas por enzimas en el interior de las células se encuentran funcionalmente organizadas en muchas secuencias diferentes de reacciones consecutivas denominadas **rutas,** en las que el producto de una reacción pasa a ser el reactivo de la siguiente. Algunas de estas rutas degradan nutrientes orgánicos transformándolos en productos finales simples, con el fin de extraer de ellos energía química y convertirla en una forma útil para la célula; en conjunto, estas reacciones degradativas productoras de energía libre reciben el nombre de **catabolismo.** La energía liberada por las reacciones catabólicas es usada en la síntesis del ATP. Como resultado de ello, la concentración celular de ATP se halla lejos de su concentración en el equilibrio, de modo que la ΔG de la hidrólisis del ATP es grande y negativa. De modo similar, el metabolismo tiene como resultado la producción de los transportadores de electrones reducidos NADH y NADPH, que pueden donar electrones en procesos que generan ATP o alimentar pasos reductores en vías biosintéticas.

Otras rutas parten de pequeñas moléculas precursoras convirtiéndolas en moléculas progresivamente mayores y más complejas, entre las que se incluyen las proteínas y los ácidos nucleicos. Estas rutas sintéticas requieren invariablemente un aporte de energía, y en conjunto se denominan **anabolismo.** La compleja red de reacciones catalizadas por enzimas constituye el **metabolismo** celular. El ATP—y los nucleósidos trifosfatos energéticamente equivalentes citidina trifosfato (CTP), uridina trifosfato (UTP) y guanosina trifosfato (GTP)— es el principal nexo de unión entre los componentes anabólicos y catabólicos de esta red **(Fig. 1–28)**. Las rutas de reacciones catalizadas enzimáticamente que actúan sobre los principales constituyentes de las células —proteínas, grasas, azúcares y ácidos nucleicos— son virtualmente idénticas en todos los organismos vivos.

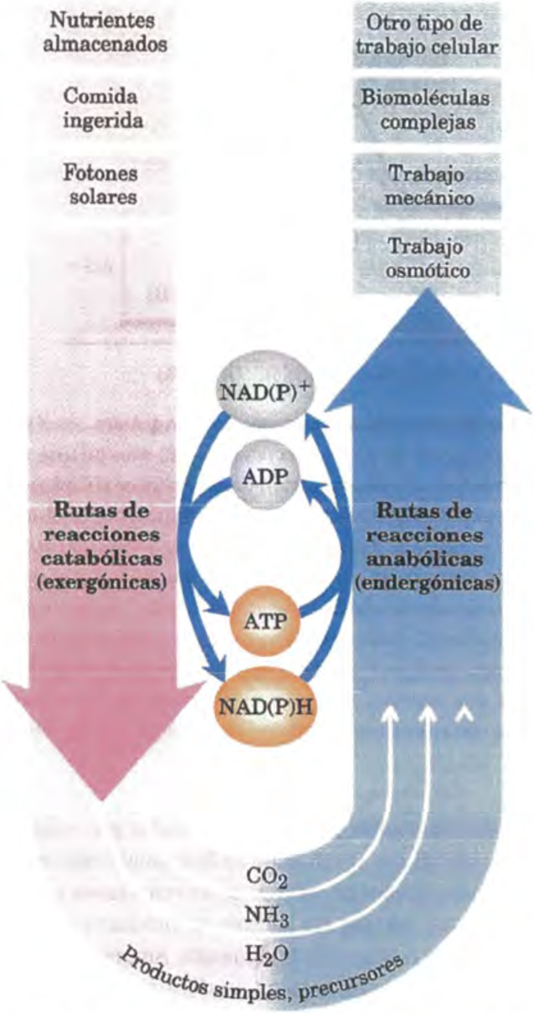
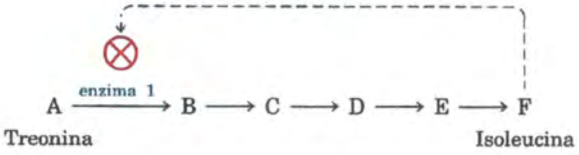


FIGURA 1–28 Papel central del ATP y el NAD(P)H en el metabolismo. El ATP es el intermediario químico común que conecta los procesos que liberan energía con aquellos que requieren aporte de energía. Su papel en la célula es análogo al del dinero en las relaciones comerciales: se "gana/produce" en reacciones exergónicas y se "gasta/consume" en las endergónicas. El NAD(P)H (dinucleótido de nicotinamida y adenina (fosfato)) es un cofactor transportador de electrones que capta electrones en reacciones oxidativas y a continuación los dona en una gran variedad de reacciones biosintéticas de reducción. Presentes en concentraciones relativamente pequeñas, estos cofactores esenciales para las reacciones anabólicas deben ser constantemente regenerados por reacciones catabólicas.

El metabolismo está regulado para conseguir equilibrio y economía

Las células vivas no son sólo capaces de sintetizar simultáneamente miles de clases diferentes de moléculas de glúcidos, grasas, proteínas y ácidos nucleicos y sus subunidades más sencillas sino que además son capaces de hacerlo en las proporciones precisas que son necesarias para la célula en cualquier situación. Cuando, por ejemplo, se produce un crecimiento celular rápido, deben sintetizarse grandes cantidades de precursores de proteínas y ácidos nucleicos, mientras que en condiciones de no crecimiento la necesidad de estos precursores se encuentra muy reducida. Los enzimas clave de cada ruta metabólica están regulados de manera que cada tipo de molécula precursora se sintetiza en la cantidad adecuada a las necesidades reales de la célula.

Considérese la ruta de *E. coli* que conduce a la síntesis del aminoácido isoleucina, uno de los constituyentes de las proteínas. La ruta consta de cinco reacciones, catalizadas cada una por un enzima diferente (las letras A a F representan los intermediarios de la ruta):



Si una célula empieza a producir más isoleucina de la necesaria para la síntesis proteica, la isoleucina no utilizada se acumula y este incremento en la concentración inhibe la actividad catalítica del primer enzima de la ruta, con lo que se frena inmediatamente la producción de isoleucina. Esta **inhibición por retroalimentación** mantiene el equilibrio entre producción y utilización de cada intermediario metabólico. (A lo largo del libro usaremos el símbolo ⊗ para indicar inhibición de una reacción enzimática.)

A pesar de que sea útil para la organización y la comprensión del metabolismo, el concepto de ruta discreta constituye una simplificación. En la célula existen miles de intermediarios metabólicos, muchos de los cuales forman parte de más de una ruta. El metabolismo se representa mejor como una red de rutas interconectadas e interdependientes donde la variación en la concentración de cualquier metabolito da inicio a un efecto en cadena que influye en el flujo de materiales a través de otras rutas. La comprensión de estas complejas interacciones entre intermediarios y rutas en términos cuantitativos es una tarea enorme que puede parecer desalentadora, pero el impulso actual en la **biología de sistemas,** que se discute en el Capítulo 15, ha empezado a ofrecer nuevos puntos de vista sobre la regulación global del metabolismo.

Las células también regulan la síntesis de sus propios catalizadores, los enzimas, en respuesta a la variación en las necesidades de un producto metabólico; este tema es tratado en el Capítulo 28. La expresión de los genes (la traducción de la información del DNA en proteínas celulares activas en la célula) y la síntesis de los enzimas son otros niveles de control metabólico. Todos ellos deben ser tenidos en cuenta al describir el control global del metabolismo.

RESUMEN 1.3 Fundamentos físicos

- Las células vivas son sistemas abiertos que intercambian materia y energía con su entorno, extrayendo y canalizando energía para mantenerse en un estado estacionario dinámico distante del equilibrio. La energía se obtiene de la luz solar o de los combustibles, convirtiendo la energía de un flujo electrónico en energía de los enlaces químicos del ATP.
- La tendencia de una reacción química a llegar al equilibrio puede expresarse como la variación en su energía libre,

ΔG, que tiene dos componentes: variación de entalpía, ΔH, y variación de entropía, ΔS. Estas variables se relacionan entre ellas por la ecuación $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

- Cuando la ΔG de una reacción es negativa, la reacción es exergónica y tiende a llegar a su fin; cuando ΔG es positiva, la reacción es endergónica y tiende a avanzar en la dirección opuesta. Cuando dos reacciones se suman para dar lugar a una tercera reacción, la ΔG de la reacción global es la suma de las ΔG de las reacciones individuales.
- Las reacciones de conversión de ATP en P_i y ADP o en AMP y PP_i son altamente exergónicas (ΔG negativa y de valor elevado). Muchas reacciones celulares endergónicas son posibles gracias al acoplamiento, a través de intermediarios comunes, con estas reacciones altamente exergónicas.
- La variación de energía libre estándar de una reacción, $\Delta G°$, es una constante física relacionada con la constante de equilibrio mediante la ecuación $\Delta G° = -RT \ln K_{eq}$.
- La mayor parte de las reacciones celulares tienen lugar a velocidades útiles gracias a que existen enzimas que las catalizan. Los enzimas actúan en parte estabilizando el estado de transición, reduciendo la energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$, e incrementando la velocidad de reacción en muchos órdenes de magnitud. La actividad catalítica de los enzimas en las células está regulada.
- El metabolismo es la suma de muchas secuencias de reacciones interconectadas en las que se interconvierten metabolitos celulares. Cada secuencia está regulada de manera que produzca lo que la célula necesita en cada momento y consuma sólo la energía necesaria para ello.

(a) (b)

FIGURA 1–29 Dos escrituras antiguas. (a) El Prisma de Senaquerib, inscrito aproximadamente en el 700 a. C., describe algunos hechos históricos acaecidos durante el reinado del rey Senaquerib en caracteres de la lengua asiria. El Prisma contiene aproximadamente 20.000 caracteres, pesa 50 kg y ha sobrevivido prácticamente intacto durante 2.700 años. (b) La molécula única de DNA de la bacteria *E. coli*, observada durante el proceso de filtrado hacia el exterior de la célula lisada, es centenares de veces más larga que la célula misma y contiene codificada toda la información necesaria para especificar la estructura y las funciones de la célula. El DNA bacteriano contiene aproximadamente 4,6 millones de caracteres (nucleótidos), pesa menos de 10^{-10} g y sólo ha sufrido cambios menores durante los últimos millones de años. (Los puntos amarillos y las manchas oscuras de la micrografía electrónica coloreada son artefactos de la preparación.)

1.4 Fundamentos genéticos

Posiblemente, la propiedad más remarcable de las células y organismos vivos es su capacidad para reproducirse con fidelidad casi perfecta a lo largo de incontables generaciones. Esta continuidad de rasgos heredados significa que, a lo largo de millones de años, la estructura de las moléculas que contienen la información genética ha debido permanecer constante. Muy pocas huellas históricas de la civilización, incluidas las grabadas sobre cobre o talladas sobre piedra **(Fig. 1–29)**, han logrado sobrevivir más de un milenio. Pero existen pruebas convincentes de que las instrucciones genéticas de los organismos vivos han permanecido prácticamente inalteradas durante períodos mucho más largos; muchas bacterias tienen aproximadamente el mismo tamaño, forma y estructura interna, y contienen el mismo tipo de moléculas precursoras y enzimas que las que vivieron hace aproximadamente cuatro mil millones de años. Esta continuidad en estructura y composición es el resultado de la continuidad en la estructura del material genético.

El descubrimiento de la naturaleza química y la estructura tridimensional del material genético, el **ácido desoxirribonucleico** o **DNA,** se cuenta entre los hitos fundamentales de la biología del siglo XX. La secuencia de sus subunidades monoméricas, los nucleótidos (o más exactamente, los desoxirribonucleótidos, tal como se verá más adelante) de este polímero lineal lleva codificadas las instrucciones para formar todos los demás componentes celulares y actúa además de molde para la producción de moléculas idénticas de DNA que serán distribuidas a la progenie al dividirse la célula. La perpetuación de una especie biológica exige que su información genética se mantenga estable, se exprese de manera precisa en forma de productos génicos y se reproduzca con un mínimo de errores. La corrección y efectividad en el almacenaje, la expresión y la reproducción del mensaje genético define a las especies individuales, las distingue de las demás y asegura su continuidad a lo largo de generaciones sucesivas.

La continuidad genética reside en las moléculas de DNA

El DNA es un polímero orgánico largo y delgado, una molécula peculiar que está construida en una dimensión a escala atómica (anchura) y en otra dimensión a escala humana (longitud: una molécula de DNA puede medir varios centímetros). Un espermatozoide o un óvulo humanos, que transportan la información hereditaria acumulada a lo largo de miles de millones de años de evolución, transmiten esta herencia en forma de moléculas de DNA en las que el mensaje genético está codificado en la secuencia lineal de las subunidades de nucleótido unidas covalentemente.

Cuando hablamos de las propiedades de una especie química solemos describir el comportamiento medio de un número muy grande de moléculas idénticas. La predicción del comportamiento de una molécula individual en una cantidad de, por ejemplo, un picomol de un compuesto (unas 6×10^{11} moléculas) resulta difícil, pero es más sencillo predecir el comporta-

miento *medio* de las moléculas gracias al gran número de ellas que es posible incluir en este promedio. En este aspecto, el DNA celular es una excepción. El DNA de una célula de *E. coli* es una *única molécula* que contiene 4,64 millones de pares de nucleótidos y constituye todo su material genético. Esta molécula única debe replicarse perfectamente en todos sus detalles para que *E. coli* genere una progenie idéntica mediante la división celular; en este caso no es, por tanto, posible pensar en un comportamiento medio, o estadístico. Lo mismo ocurre en todas las demás células. Un espermatozoide humano aporta al óvulo que fecunda una sola molécula de DNA en cada uno de los 23 cromosomas diferentes, que se combinan con una sola molécula de DNA en cada uno de los correspondientes cromosomas del óvulo. El resultado de esta unión es fácilmente predecible: un embrión que contiene la totalidad de sus ~25.000 genes, formado por 3 mil millones de pares de nucleótidos, e intacto: ¡una asombrosa proeza química!

EJEMPLO PRÁCTICO 1–1 Fidelidad de la replicación del DNA

Calcule el número de veces que se ha copiado el DNA de una célula de *E. coli* desde el momento de la aparición de su precursor bacteriano más ancestral hace aproximadamente 3.500 millones de años. Considere que, en promedio, se ha producido una división celular cada 12 horas (esto constituye una sobreestimación para las bacterias modernas y probablemente una infraestimación para las más antiguas).

Solución:

$$(1\ \text{generación}/12\ \text{h})(24\ \text{h/día})(365\ \text{días/año})(3{,}5 \times 10^9\ \text{años}) = 2{,}6 \times 10^{12}\ \text{generaciones.}$$

Una sola página de este libro contiene unos 5.000 caracteres, por lo que el libro completo contiene unos 5 millones de caracteres. El cromosoma de *E. coli* también contiene unos 5 millones de caracteres (pares de bases). Si hiciera una copia a mano de este libro y la pasase a un compañero de clase para que la copiara a mano y esta copia fuese, a su vez, copiada por un tercer compañero de clase, y así sucesivamente, ¿en qué grado se parecería cada copia sucesiva al original? Ahora imagine el libro de texto que resultaría después de copiar a mano este ejemplar ¡unos cuantos billones de veces!

La estructura del DNA hace posible su reparación y replicación con fidelidad casi perfecta

La capacidad de las células vivas de preservar su material genético y duplicarlo para su transmisión a la generación siguiente es el resultado de la complementariedad estructural entre las dos mitades de la molécula de DNA (**Fig. 1–30**). La unidad básica del DNA es un polímero lineal formado por cuatro subunidades monoméricas diferentes, los **desoxirribonucleótidos,** ordenados en una secuencia lineal precisa. En esta secuencia lineal se encuentra codificada la información genética. Dos de estas cadenas poliméricas se enrollan una sobre la otra para formar la doble hélice de DNA, en la que cada subunidad monomérica de una cadena queda específicamente aparejada con un desoxirribonucleótido complementario de la cadena opuesta. Antes de producirse la división celular, las dos cadenas de DNA se separan y actúan de molde para la síntesis de otra cadena complementaria nueva, con lo que se generan dos moléculas de doble hélice idénticas, una para cada célula hija. Si una cadena resultase dañada, la continuidad de la información queda asegurada por la información presente en la cadena complementaria, que actuará de molde para la reparación de la lesión.

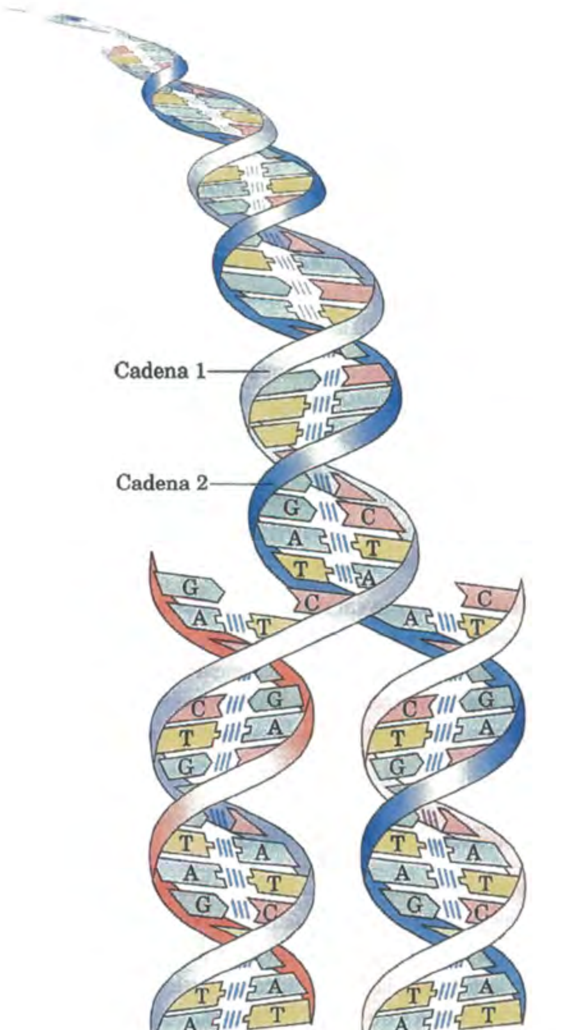


FIGURA 1–30 Complementariedad entre las dos cadenas del DNA. El DNA es un polímero lineal de cuatro desoxirribonucleótidos desoxiadenilato (A), desoxiguanilato (G), desoxicitidilato (C) y desoxitimidilato (T), unidos covalentemente. Cada uno de los nucleótidos, gracias a su precisa estructura tridimensional, posee la capacidad de asociarse muy específicamente, pero no de modo covalente, con otro de los nucleótidos en la cadena complementaria: A se asocia siempre con su complementario T y G siempre con C. En la molécula de DNA de doble cadena, la secuencia de nucleótidos de una hebra o cadena es *complementaria* con la secuencia de la otra. Las dos cadenas del DNA, unidas por muchos puentes de hidrógeno (representadas aquí por líneas verticales azules) entre los pares de nucleótidos complementarios, se enrollan una sobre la otra para formar la doble hélice del DNA. En la replicación del DNA, las dos cadenas (en azul) se separan y se sintetizan dos cadenas nuevas (en rosa), cada una con una secuencia complementaria a la de una de las cadenas originales. El resultado es dos moléculas de DNA en doble hélice, cada una de ellas idéntica al DNA original.

La secuencia lineal del DNA codifica proteínas con estructuras tridimensionales

La información está codificada en el DNA en su secuencia lineal (monodimensional) de subunidades desoxirribonucleotídicas, pero la expresión de esta información da como resultado una célula tridimensional. La transición entre una y tres dimensiones ocurre en dos fases. Una secuencia lineal de desoxirribonucleótidos del DNA codifica (a través de un intermediario, el RNA) la producción de una proteína con la secuencia lineal correspondiente, en este caso de aminoácidos **(Fig. 1–31)**. La proteína se pliega adoptando una estructura tridimensional particular, determinada por su secuencia de aminoácidos y estabilizada principalmente por interacciones no covalentes. Aunque la forma final de la proteína plegada viene dictada por su secuencia de aminoácidos, el proceso de plegamiento recibe la asistencia de proteínas que actúan como "chaperonas moleculares" (véase la Fig. 4–29). La adopción de una estructura tridimensional precisa, o **conformación nativa,** es crucial para la función de la proteína.

Una vez que la proteína ha adoptado su conformación nativa, puede asociarse de modo no covalente con otras macromoléculas (otras proteínas, o bien con ácidos nucleicos o lípidos), para formar complejos supramoleculares tales como cromosomas, ribosomas y membranas. Las moléculas individuales de estos complejos poseen sitios de unión específicos y de alta afinidad para las demás y son capaces de formar espontáneamente complejos funcionales en el medio celular.

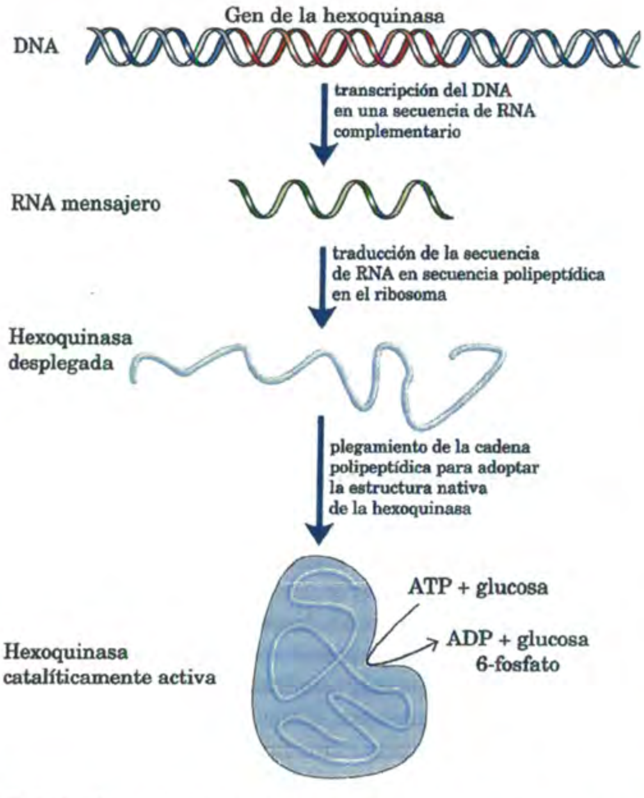


FIGURA 1–31 Del DNA al RNA a la proteína al enzima (hexoquinasa). La secuencia lineal de desoxirribonucleótidos del DNA (el gen) que codifica la proteína hexoquinasa se transcribe primero en una molécula de ácido ribonucleico (RNA) con secuencia de ribonucleótidos complementaria. La secuencia de RNA (RNA mensajero) se traduce posteriormente en la cadena lineal de la proteína hexoquinasa, que se pliega para adoptar su conformación tridimensional nativa, a menudo con la ayuda de las chaperonas moleculares. Una vez adoptada su forma nativa, la hexoquinasa adquiere su capacidad catalítica: cataliza la fosforilación de la glucosa usando ATP como donador del grupo fosforilo.

A pesar de que las secuencias de las proteínas contienen toda la información necesaria para alcanzar su estado nativo, también es necesario un entorno adecuado (de pH, fuerza iónica, concentración de iones metálicos, etc.) para que el plegamiento y el autoensamblaje sean correctos. Por tanto, la secuencia del DNA no es capaz por sí sola de dictar la formación de una célula.

RESUMEN 1.4 Fundamentos genéticos

- La información genética está codificada en la secuencia lineal de cuatro tipos de desoxirribonucleótidos en el DNA.
- La molécula de DNA en doble hélice contiene un molde interno que permite su propia replicación y reparación.
- La secuencia lineal de aminoácidos de una proteína, codificada en el DNA del gen de esa proteína, da lugar a una estructura tridimensional proteica que es exclusiva para esa proteína en un proceso que depende de las condiciones ambientales.
- Ciertas macromoléculas individuales con afinidad específica para con otras macromoléculas se autoensamblan formando complejos supramoleculares.

1.5 Fundamentos evolutivos

Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución.

—*Theodosius Dobzhansky,* The American Biology Teacher, *marzo de 1973*

Los grandes progresos que se han producido en bioquímica y en biología molecular durante las décadas transcurridas desde que Dobzhansky hizo esta contundente generalización han confirmado su validez. El alto grado de similitud entre las vías metabólicas y las secuencias génicas de organismos de todos los phyla es un robusto argumento a favor de la hipótesis de que todos los organismos modernos descienden de un progenitor evolutivo común a través de una larga serie de pequeños cambios (mutaciones), que conferían, en cada caso, una ventaja selectiva a un organismo dado en un nicho ecológico concreto.

Los cambios en las instrucciones hereditarias hacen posible la evolución

A pesar de la fidelidad casi perfecta de la replicación genética, ciertos errores muy poco frecuentes que no han sido reparados durante la replicación del DNA producen variaciones en la secuencia nucleotídica del DNA, dando lugar a una **mutación (Fig. 1–32)** que cambia las instrucciones para alguno de los componentes celulares. Una reparación incorrecta de una lesión en una de las cadenas de DNA tiene el mismo efecto. Las mutaciones en el DNA que se transmite a los descendientes –es decir, mutaciones en las células reproductoras– pueden ser dañinas o incluso letales para el nuevo organismo o célula; pueden, por ejemplo, provocar la síntesis de un enzima defectuoso incapaz de

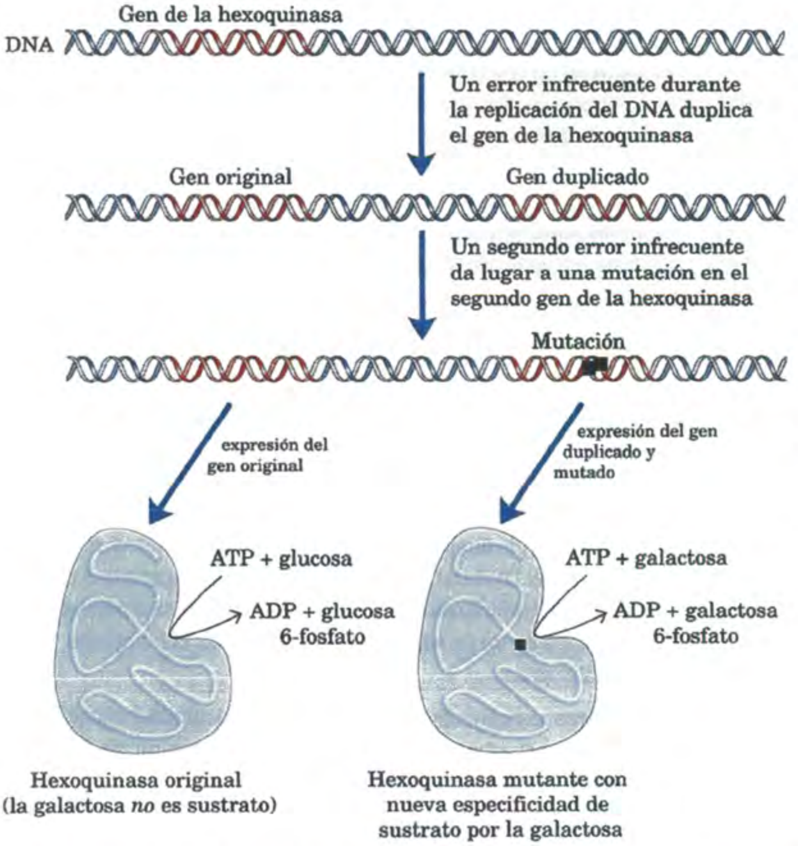


FIGURA 1–32 Duplicación génica y mutación: una forma de generar actividades enzimáticas nuevas. En este ejemplo, el gen único de la hexoquinasa de un organismo hipotético podría ser copiado accidentalmente dos veces durante la replicación del DNA, de modo que el organismo acabara teniendo dos copias del gen, una de ellas superflua. A lo largo de muchas generaciones, y a causa de la repetida duplicación del DNA con dos genes de hexoquinasa, se producen errores que, a pesar de su baja frecuencia, dan lugar a cambios en el gen superfluo y en la proteína que codifica. En unos pocos casos raros, la proteína producida por este gen mutante se altera de forma que puede unirse a un nuevo sustrato, galactosa en nuestro caso hipotético. La célula que contiene el gen mutante ha adquirido una capacidad nueva (metabolismo de la galactosa), que le puede permitir sobrevivir en un nicho ecológico en el que exista suministro de galactosa pero no de glucosa. Si no se produce duplicación génica previamente a la mutación se pierde la función original del gen.

catalizar una reacción metabólica esencial. Sin embargo, una mutación puede dar lugar ocasionalmente a un organismo *mejor* preparado para sobrevivir en su entorno. El enzima mutante podría, en este caso, haber adquirido una especificidad ligeramente diferente que lo convierte en capaz de utilizar cierto compuesto que la célula era incapaz de metabolizar antes de producirse la mutación. Si una población de células se encontrase en un entorno en el que este compuesto fuera el único o el más abundante de los nutrientes disponibles, la célula mutante tendría ventajas selectivas sobre las otras células no mutantes (de **tipo silvestre, *wild type***) de la población. La célula mutante y su progenie sobrevivirían y prosperarían en el nuevo entorno mientras que las células del tipo silvestre no dispondrían de nutrientes y perecerían. Esto es lo que Darwin quiso decir con la expresión "supervivencia del más adaptado en condiciones de presión selectiva", la base del proceso de la selección natural.

En ocasiones se produce la introducción de una segunda copia de un gen entero en el cromosoma resultado de una replicación defectuosa del mismo. La segunda copia es superflua, con lo que las mutaciones que se produzcan en este segundo gen no serán nocivas; ésta constituye otra forma de evolución celular puesto que implica la producción de un nuevo gen con una nueva función al tiempo que se retienen el gen y la función originales. Desde este punto de vista, las moléculas de DNA de los organismos modernos son como documentos históricos llenos de datos que hablan del largo viaje entre las primeras células y los organismos actuales. Sin embargo, los datos históricos contenidos en el DNA no son completos; a lo largo de la evolución se han borrado muchas de las mutaciones, o se ha escrito sobre ellas. A pesar de ello, las moléculas de DNA son la mejor fuente de historia biológica disponible. La frecuencia de errores en la replicación del DNA es fruto del equilibrio entre un número excesivo de errores, que convertirían en no viables a las células hija, y demasiado pocos, que harían imposible la variación genética que permite la supervivencia de las células mutantes en nuevos nichos ecológicos.

Varios miles de millones de años de selección adaptativa han conducido al refinamiento de los sistemas celulares, haciéndolos capaces de obtener el máximo provecho de las propiedades físicas y químicas de los materiales crudos del entorno. Las variaciones genéticas producidas al azar entre individuos de una población, combinadas con la selección natural, han generado la evolución de la enorme variedad actual de organismos, cada uno de ellos adaptado a su nicho ecológico particular.

Las primeras biomoléculas aparecieron por evolución química

En nuestros comentarios anteriores hemos pasado por alto el primer capítulo de la historia de la evolución: la aparición de la primera célula viva. Aparte de su presencia en los organismos vivos, los compuestos orgánicos, entre los que se incluyen las biomoléculas básicas tales como los aminoácidos y los glúcidos, se encuentran presentes únicamente en muy pequeñas cantidades en la corteza terrestre, el mar y la atmósfera. ¿Cómo adquirieron los primeros organismos vivos sus sillares estructurales orgánicos característicos? Existe una hipótesis que sostiene que estos compuestos se crearon como consecuencia de la acción de poderosas fuerzas atmosféricas –radiación ultravioleta, relámpagos o erupciones volcánicas– sobre los gases existentes en la atmósfera prebiótica de la Tierra y sobre los compuestos inorgánicos disueltos en los respiraderos hidrotérmicos de los fondos oceánicos.

Esta hipótesis fue puesta a prueba en un experimento clásico sobre el origen abiótico (no biológico) de las biomoléculas orgánicas realizado en 1953 por Stanley Miller en el laboratorio de Harold Urey. Miller sometió mezclas gaseosas similares a las que se

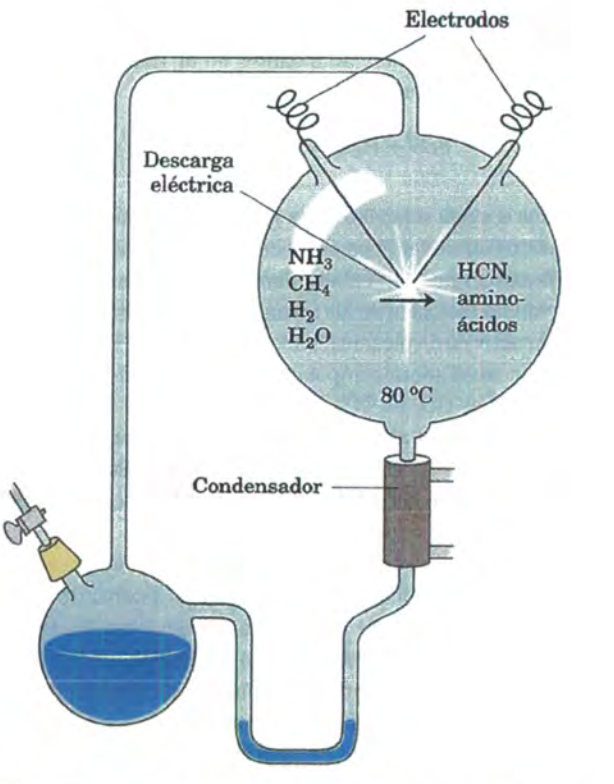


FIGURA 1–33 Producción abiótica de biomoléculas. Aparato de descargas eléctricas del tipo utilizado por Miller y Urey en los experimentos en que demostraron la formación abiótica de compuestos orgánicos en condiciones atmosféricas primitivas. Después de someter el contenido gaseoso del sistema a descargas eléctricas se recogieron los productos por condensación. Entre esos productos se encontraron biomoléculas tales como los aminoácidos.

presumía que existían en la Tierra prebiótica y que incluían NH_3, CH_4, H_2O y H_2 a descargas eléctricas producidas entre un par de electrodos (con el fin de simular las descargas de un relámpago) durante periodos iguales o superiores a una semana y a continuación analizó el contenido del recipiente de reacción que se había mantenido cerrado **(Fig. 1–33)**. La fase gaseosa de la mezcla resultante contenía CO y CO_2 además de los gases iniciales. La fase acuosa contenía una mezcla de compuestos orgánicos entre los que se incluían algunos aminoácidos, hidroxiácidos, aldehídos y cianuro de hidrógeno (HCN). Este experimento demostró que la producción abiótica de biomoléculas era posible en tiempos relativamente cortos y en condiciones relativamente suaves.

Experimentos más refinados han demostrado que muchos de los componentes químicos de las células vivas, entre los que se incluyen polipéptidos y moléculas parecidas al RNA, se pueden formar en estas condiciones. Los polímeros de RNA pueden actuar como catalizadores en ciertas reacciones biológicas (véanse los Capítulos 26 y 27), por lo que es posible que el RNA jugara un papel crucial en la evolución prebiótica gracias a su doble capacidad como catalizador y como depositario de la información.

Los primeros genes y catalizadores podrían haber sido moléculas de RNA o precursores relacionados

En los organismos modernos, los ácidos nucleicos codifican la información genética que especifica la estructura de los enzimas, mientras que los enzimas poseen la capacidad de catalizar los procesos de replicación y reparación de los ácidos nucleicos. La mutua dependencia de estas dos clases de biomoléculas hace que surja una duda desconcertante: ¿Quién apareció primero, el DNA o las proteínas?

La respuesta podría bien ser que aparecieron al mismo tiempo y que el RNA les precedió a los dos. El descubrimiento de que las moléculas de RNA pueden actuar como catalizadores de su propio proceso de formación sugiere que el RNA o una molécula similar pudo haber sido a la vez el primer gen *y* el primer catalizador. De acuerdo con este concepto **(Fig. 1–34)**, una de las primeras etapas de la evolución biológica habría sido la formación al azar, en la sopa primordial, de una molécula de RNA capacitada para catalizar la formación de otras moléculas de RNA con la misma secuencia: una molécula de RNA autorreplicante y autoperpetuante. La concentración de moléculas de RNA autorreplicantes se incrementaría exponencialmente al formarse dos moléculas a partir de una, cuatro a partir de dos y así sucesivamente. Es presumible que la fidelidad de la reproducción fuese mucho menos que perfecta, de modo que el proceso permitiría la generación de variantes de la molécula de RNA, algunas de las cuales podrían ser más eficaces en su autorreplicación. En la competencia por la utilización de los nucleótidos, las secuencias autorreplicantes más eficientes saldrían más beneficiadas, mientras que las menos eficientes desaparecerían del medio.

FIGURA 1–34 Posible situación en un "mundo de RNA".

De acuerdo con la hipótesis del "mundo del RNA", la división de funciones entre el DNA (almacenamiento de la información genética) y las proteínas (catálisis) se produjo en una etapa más tardía. Se desarrollaron nuevas variantes de moléculas de RNA autorreplicantes que poseían la capacidad adicional de catalizar la condensación de aminoácidos en forma de péptidos. Ocasionalmente los péptidos así formados habrían sido capaces de potenciar la capacidad autorreplicativa del RNA, y el conjunto RNA-péptido podría haber sufrido variaciones secuenciales que generarían moléculas aun más eficientes. El importante descubrimiento de que en la maquinaria encargada de la síntesis de proteínas (ribosomas) son moléculas de RNA, y no de proteína, las que catalizan la formación del enlace peptídico, está de acuerdo con la hipótesis del mundo del RNA.

Cierto tiempo después de la evolución de este sistema primitivo de síntesis de proteínas se produjo otro avance: aparecieron moléculas de DNA con secuencias complementarias a las de RNA autorreplicante, que reemplazaron a estas últimas en la función de conservar la información "genética", mientras que las moléculas de RNA evolucionaron para actuar en la síntesis de proteínas. (En el Capítulo 8 se explica la razón de que el DNA sea una molécula más estable que el RNA y, por tanto, un mejor depositario de la información hereditaria.) Las proteínas demostraron poder comportarse como catalizadores versátiles y asumieron con el tiempo esta función. Los compuestos lipídicos de esta sopa primordial pudieron formar capas relativamente impermeables capaces de envolver a grupos de moléculas autorreplicantes. La concentración de proteínas y ácidos nucleicos en el interior de estos compartimientos lipídicos favoreció las interacciones moleculares necesarias para los procesos de autorreplicación.

La evolución biológica empezó hace más de tres mil quinientos millones de años

La Tierra se formó hace aproximadamente 4.600 millones de años, y la primera prueba concluyente de la existencia de vida es de más de unos 3.500 millones de años. En 1996, científicos que trabajaban en Groenlandia encontraron pruebas químicas de vida ("moléculas fósiles") de una antigüedad de unos 3.850 millones de años consistentes en formas de carbono incrustadas en roca que parecían tener un origen claramente biológico. En algún lugar de la Tierra y durante los primeros mil millones de años, apareció el primer organismo simple, capaz de replicar su propia estructura a partir de un molde (¿RNA?) que fue el primer material genético. Dado que en los tiempos del amanecer de la vida la atmósfera terrestre era prácticamente carente de oxígeno, y además existían pocos microorganismos que pudieran consumir los compuestos orgánicos formados mediante procesos naturales, éstos eran relativamente estables. Sumada esta estabilidad y eones de tiempo, lo improbable acabó volviéndose inevitable: los compuestos orgánicos se incorporaron a células en evolución para producir catalizadores autorreplicativos cada vez más efectivos. El proceso de evolución biológica había empezado.

La primera célula utilizó probablemente combustibles inorgánicos

Las primeras células aparecieron en una atmósfera reductora (no había oxígeno) y, probablemente, obtuvieron la energía de combustibles inorgánicos tales como el sulfuro ferroso y el carbonato ferroso, ambos muy abundantes en la Tierra primitiva. Por ejemplo, la reacción

$$FeS + H_2S \rightarrow FeS_2 + H_2$$

proporciona energía suficiente para promover la síntesis de ATP y compuestos similares. Los compuestos orgánicos que estas células requerían podrían haber aparecido como consecuencia de la acción no biológica de las tormentas eléctricas o del calor debido a la actividad volcánica o a los respiraderos hidrotérmicos de los océanos sobre componentes de la atmósfera primitiva tales como el CO, el CO_2, el N_2, el NH_3 y el CH_4. Se ha propuesto una fuente alternativa de compuestos orgánicos: el espacio extraterrestre. En 2006, la misión espacial Stardust trajo pequeñas partículas de polvo de la cola de un cometa que contenían diversos compuestos orgánicos.

Los primeros organismos unicelulares fueron adquiriendo gradualmente la capacidad de obtener energía a partir de compuestos de su entorno y de utilizar esa energía para sintetizar una cantidad creciente de sus propias moléculas precursoras para ser gradualmente menos dependientes de fuentes externas. Un acontecimiento evolutivo muy significativo fue el desarrollo de pigmentos capaces de capturar la energía de la luz visible del sol y usar su energía en la reducción o "fijación" del CO_2 para producir compuestos orgánicos más complejos. Es probable que el donador de electrones original para estos procesos **fotosintéticos** fuera el H_2S, que genera azufre elemental o sulfato (SO_4^{2-}) como productos secundarios; posteriormente, otras células desarrollaron la capacidad enzimática de utilizar H_2O como donador de electrones en las reacciones fotosintéticas, lo que implicaba la eliminación de O_2 como producto de desecho. Las cianobacterias son los descendientes modernos de estos primitivos productores fotosintéticos de oxígeno.

Dado que la atmósfera de la Tierra prácticamente no contenía oxígeno en los primeros estadios de la evolución biológica, las células primitivas eran anaeróbicas. En estas condiciones, los quimiótrofos podían oxidar compuestos orgánicos a CO_2 sin transferir electrones al O_2 sino a aceptores tales como el SO_4^{2-}, dando H_2S como producto. Con la aparición de las bacterias fotosintéticas productoras de O_2, la atmósfera fue enriqueciéndose progresivamente en oxígeno, un poderoso oxidante y un veneno mortal para los organismos anaeróbicos. Respondiendo a la presión evolutiva de lo que Lynn Margulis y Dorion Sagan han llamado el "holocausto del oxígeno", algunos linajes de microorganismos dieron lugar a los aerobios que obtenían su energía mediante el transporte de electrones desde moléculas de combustible hacia el oxígeno. Gracias a que las transferencias de electrones desde moléculas orgánicas al O_2 desprenden mucha energía, los organismos aeróbicos disfrutaron de ventajas energéticas sobre los anaeróbicos cuando ambos competían en un ambiente que contenía oxígeno. Esta ventaja dio como resultado el predominio de los organismos aeróbicos en ambientes ricos en O_2.

Las bacterias y arqueas actuales habitan en la práctica totalidad de nichos ecológicos de la biosfera habiendo organismos capaces de usar casi todos los tipos de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Los microbios fotosintéticos de aguas dulces y saladas captan la energía solar y la utilizan en la formación de glúcidos y demás compuestos celulares, los

cuales por su parte son utilizados como alimento por otras formas de vida. El proceso evolutivo continúa, y en el caso de las bacterias de reproducción rápida en una escala de tiempo que nos permite observarlo en el laboratorio. La producción de "protocélulas" en el laboratorio implica la determinación del número mínimo de genes necesario para la vida a partir de la observación de los genomas de bacterias sencillas. El genoma más pequeño conocido de una bacteria viva es el de *Mycobacterium genitalium*, que comprende 580.000 pares de bases que codifican 483 genes.

Las células eucarióticas evolucionaron a partir de precursores más sencillos a través de diversas fases

A partir de hace aproximadamente 1.500 millones de años, el registro fósil empieza a mostrar pruebas de la existencia de organismos mayores y más complejos, probablemente las primeras células eucarióticas (**Fig. 1–35**). No es posible deducir detalles acerca de los pasos evolutivos entre procariotas y eucariotas únicamente a partir del registro fósil, pero de la comparación morfológica y bioquímica de los organismos modernos se deduce la probable existencia de una secuencia de acontecimientos consistente con los datos aportados por los fósiles.

A lo largo del proceso deben haberse producido tres cambios principales. En primer lugar, al ir adquiriendo las células mayor cantidad de DNA, se perfeccionaron los mecanismos necesarios para su plegamiento en complejos discretos con proteínas específicas y para su división equitativa entre células hijas durante la división celular. Fueron necesarias proteínas especializadas para la estabilización del DNA plegado y para la segregación de los complejos proteína-DNA resultantes (*cromosomas*) durante la división celular. En segundo lugar, al aumentar el tamaño de las células, se desarrolló un sistema de membranas intracelulares que incluye una membrana doble que rodea el DNA. Esta membrana segregó el proceso nuclear de síntesis de RNA a partir de un molde de DNA del proceso citoplasmático de la síntesis de proteínas en los ribosomas. Finalmente, las células eucarióticas primitivas, incapaces de llevar a cabo la fotosíntesis o de usar metabolismo aeróbico, conjugaron sus ventajas con las de las bacterias aeróbicas o fotosintéticas para formar asociaciones **endosimbióticas** que se convirtieron en permanentes (**Fig. 1–36**). Algunas bacterias aeróbicas evolucionaron para dar lugar a las mitocondrias de los eucariotas modernos y algunas cianobacterias fotosintéticas se convirtieron en plastos, tales como los cloroplastos de las algas verdes, probables ancestros de las modernas células vegetales.

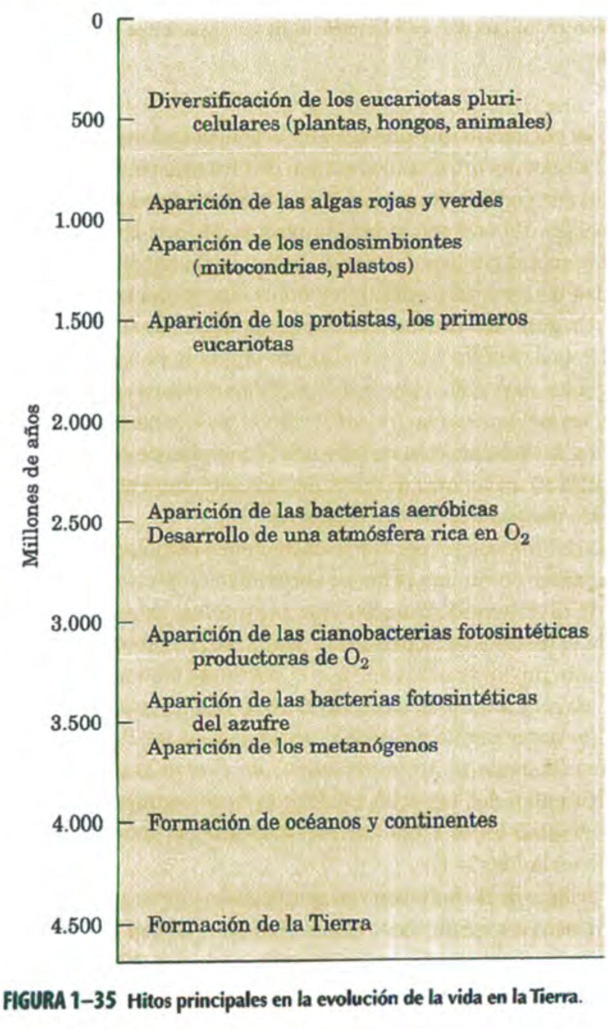


FIGURA 1–35 Hitos principales en la evolución de la vida en la Tierra.

En alguna fase posterior de la evolución, los organismos unicelulares descubrieron las ventajas de la asociación, que les permitió adquirir mayor movilidad, eficiencia y éxito reproductivo que sus competidores unicelulares. El proceso de evolución posterior de estos organismos organizados en grupos dio lugar a asociaciones permanentes entre células individuales y, finalmente, a la especialización en el seno de la colonia, es decir, a la diferenciación celular.

Las ventajas de la especialización celular impulsaron la evolución de organismos cada vez más complejos y altamente diferenciados, en los que ciertas células llevaban a cabo las funciones sensoriales, otras las funciones digestivas, fotosintéticas o reproductivas y así sucesivamente. Muchos de los organismos multicelulares modernos contienen centenares de tipos celulares distintos, estando cada uno de ellos especializado en alguna función necesaria para el organismo en su conjunto. Los mecanismos fundamentales que aparecieron inicialmente han seguido un proceso de refinamiento y mejora a lo largo de la evolución. En el movimiento de los cilios de *Paramecium* y de los flagelos de *Chlamydomonas* subyacen las mismas estructuras y mecanismos empleados en, por ejemplo, las altamente diferenciadas células espermáticas de los vertebrados.

La anatomía molecular revela relaciones evolutivas

Los bioquímicos disponen actualmente de un creciente y enormemente rico repertorio de datos sobre la anatomía molecular de las células con el que analizar las relaciones evolutivas y refinar la teoría de la evolución. Se ha determinado la secuencia del **genoma,** la información genética completa de un organismo, de centenares de bacterias, más de 40 arqueas y un número creciente de microorganismos eucarióticos tales como *Saccharomyces cerevisiae* y especies de *Plasmodium*; de plantas como *Arabidopsis thaliana* y arroz, y también de animales multicelulares como por ejemplo *Caenorhabditis elegans* (un gusano), *Drosophila melanogaster* (la mosca del vinagre), el ratón, la rata y *Homo sapiens* (Tabla 1–2). La disponibilidad de estas secuencias y la posibilidad de llevar a

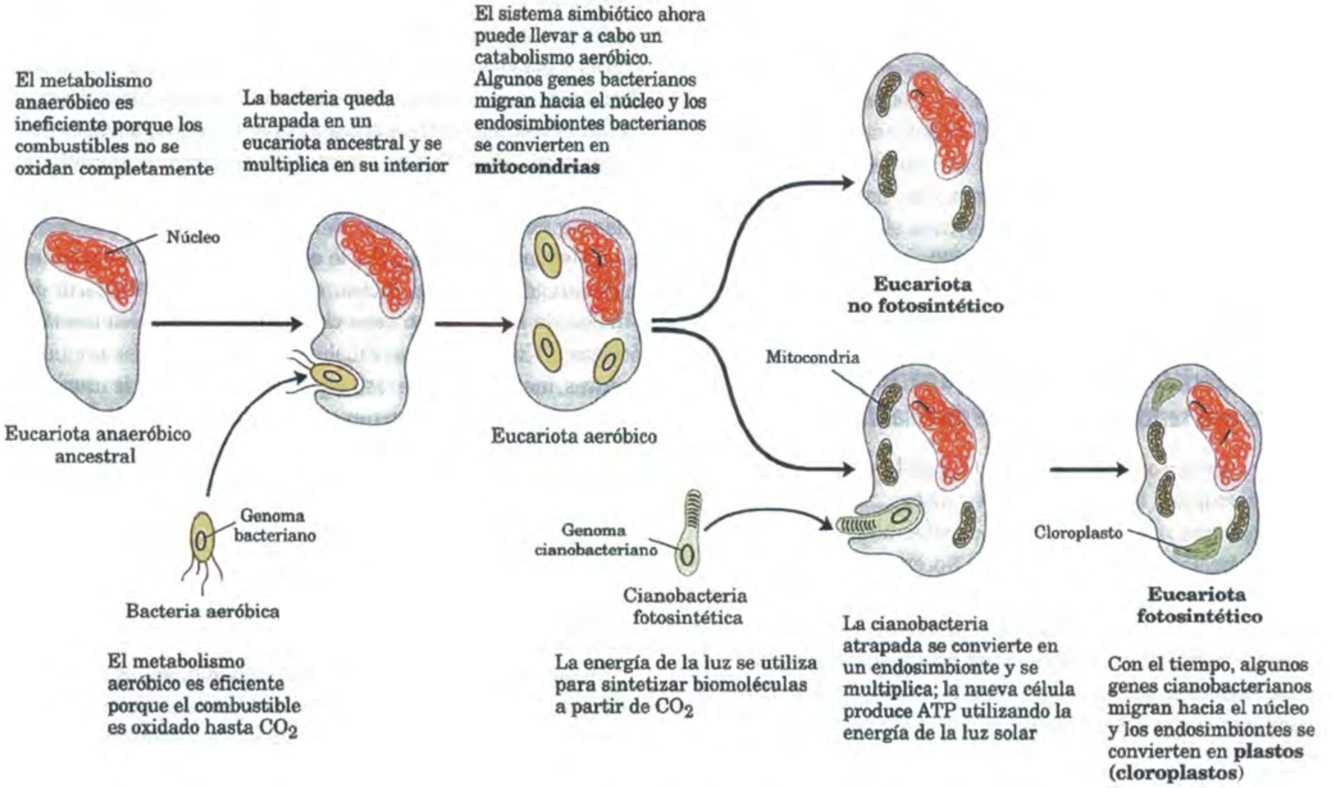


FIGURA 1–36 Evolución de los eucariotas mediante endosimbiosis. La célula eucariótica original, un organismo anaerobio, asimiló bacterias púrpura endosimbióticas (de color amarillo) que poseían la capacidad de llevar a cabo catabolismo aeróbico y se convirtieron, con el paso del tiempo, en mitocondrias. Cuando las cianobacterias fotosintéticas (verde) se convirtieron también en endosimbióticas de algunos eucariotas aeróbicos, estas células se convirtieron en los precursores fotosintéticos de las algas verdes y plantas modernas.

cabo comparaciones detalladas y cuantitativas entre especies permitirá profundizar en el proceso evolutivo. Hasta ahora, la filogenia molecular derivada de las secuencias génicas es consistente con la filogenia clásica basada en estructuras macroscópicas, y en muchos casos es más precisa. La unidad de la vida a nivel molecular es evidente a pesar de la continua divergencia de los organismos a nivel anatómico; las estructuras y los mecanismos moleculares son marcadamente similares entre los organismos más simples y los más complejos. Es a nivel de las secuencias dónde estas similitudes se aprecian mejor, ya sea en las del DNA que codifica las proteínas o en las de las proteínas mismas.

Cuando dos genes comparten secuencias muy similares fácilmente detectables (en la secuencia de nucleótidos de su DNA o en la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas), se dice que sus secuencias son homólogas y que las proteínas que codifican son **homólogos.** Si una *misma* especie contiene dos genes homólogos, estos dos genes y sus productos proteicos se denominan **parálogos.** Se piensa que los genes parálogos han aparecido por duplicación génica seguida de cambios graduales en las secuencias de cada una de las dos copias. Generalmente, las proteínas parálogas son similares no únicamente en secuencia sino también en estructura tridimensional, aunque es habitual que hayan adquirido funciones diferentes a lo largo de su evolución.

Dos genes (o proteínas) homólogos de especies *diferentes* se denominan **ortólogos.** Es frecuente observar que los ortólogos tienen la misma función en ambos organismos, por lo que cuando se encuentra que una secuencia génica recién secuenciada es altamente ortóloga con un gen de otra especie se supone que el gen codifica una proteína con la misma función en las dos especies. De este modo resulta posible deducir la función de los productos génicos a partir de la secuencia genómica, sin necesidad de caracterización bioquímica alguna del producto génico. Un **genoma anotado** contiene, además de la secuencia del DNA, una descripción de la función probable de cada producto génico deducida a partir de las comparaciones con otras secuencias genómicas con funciones proteicas establecidas. En ocasiones, la identificación de las rutas (conjuntos de enzimas) codificadas en un genoma, permite deducir directamente las capacidades metabólicas de un organismo.

Las diferencias secuenciales entre genes homólogos pueden utilizarse como una primera aproximación para medir el grado de divergencia evolutiva que presentan dos especies, es decir, el tiempo transcurrido desde que su precursor evolutivo común dio lugar a dos líneas con diferente camino evolutivo. A mayor número de diferencias secuenciales, mayor será el tiempo transcurrido desde la divergencia. Es posible construir una filogenia (o árbol evolutivo) en el cual la distancia evolutiva entre dos especies cualesquiera se represente por su proximidad en el árbol correspondiente (se muestra un ejemplo en la Fig. 1–4).

A lo largo de la evolución van apareciendo nuevas estructuras, procesos o mecanismos reguladores que reflejan los cambios en los genomas de los organismos en evolución. El genoma de un eucariota simple tal como la levadura debería poseer

TABLA 1–2 Algunos de los muchos organismos cuyos genomas han sido secuenciados completamente

Organismo	Tamaño del genoma (pares de nucleótidos)	Número de genes	Interés biológico
Mycoplasma genitalium	$5{,}8 \times 10^5$	$4{,}8 \times 10^2$	El organismo más pequeño
Treponema pallidum	$1{,}1 \times 10^6$	$1{,}0 \times 10^3$	Produce la sífilis
Borrelia burgdorferi	$9{,}1 \times 10^5$	$8{,}5 \times 10^2$	Produce la enfermedad de Lyme
Helicobacter pylori	$1{,}7 \times 10^6$	$1{,}6 \times 10^3$	Produce úlceras gástricas
Methanococcus jannaschii	$1{,}7 \times 10^6$	$1{,}7 \times 10^3$	Arquea; ¡crece a 85 °C!
Haemophilus influenzae	$1{,}8 \times 10^6$	$1{,}6 \times 10^3$	Produce la gripe bacteriana
Archaeoglobus fulgidus	$2{,}2 \times 10^6$	$2{,}4 \times 10^3$	Metanógeno a alta temperatura
Synechocystis sp.	$3{,}6 \times 10^6$	$3{,}2 \times 10^3$	Cianobacteria
Bacillus subtilis	$4{,}2 \times 10^6$	$4{,}1 \times 10^3$	Bacteria común del suelo
Escherichia coli	$4{,}6 \times 10^6$	$4{,}4 \times 10^3$	Algunas cepas son patógenas
Saccharomyces cerevisiae	$1{,}2 \times 10^7$	$5{,}9 \times 10^3$	Eucariota unicelular
Plasmodium falciparum	$2{,}3 \times 10^7$	$5{,}3 \times 10^3$	Produce la malaria humana
Caenorhabditis elegans	$1{,}0 \times 10^8$	$2{,}3 \times 10^4$	Gusano multicelular
Anopheles gambiae	$2{,}3 \times 10^8$	$1{,}3 \times 10^4$	Vector de la malaria
Arabidopsis thaliana	$1{,}2 \times 10^8$	$3{,}2 \times 10^4$	Planta modelo
Oryza sativa	$3{,}9 \times 10^8$	$3{,}8 \times 10^4$	Arroz
Drosophila melanogaster	$1{,}2 \times 10^8$	$2{,}0 \times 10^4$	Mosca de laboratorio
Mus musculus domesticus	$2{,}6 \times 10^9$	$2{,}7 \times 10^4$	Ratón de laboratorio
Pan troglodytes	$3{,}1 \times 10^9$	$4{,}9 \times 10^4$	Chimpancé
Homo sapiens	$3{,}1 \times 10^9$	$2{,}9 \times 10^4$	Ser humano

Fuente: Página en RefSeq de cada organismo en www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes.

genes relacionados con la formación de la membrana nuclear, no presentes en los procariotas. El de un insecto contendrá genes que codifiquen proteínas involucradas en la especificación de los segmentos corporales característicos de los insectos, unos genes que no se esperan en el genoma de la levadura. El genoma de todos los vertebrados debe contener genes que especifiquen el desarrollo de una columna vertebral, y los mamíferos deben poseer en exclusiva aquellos genes necesarios para el desarrollo de la placenta, una característica de los mamíferos y así sucesivamente. La comparación de genomas completos de diferentes especies de cada phylum está permitiendo la identificación de genes críticos para los cambios evolutivos en el plan corporal y el desarrollo.

La genómica funcional permite deducir la correspondencia entre genes y procesos celulares específicos

Cuando la tarea de la secuenciación del genoma y de la asignación de funciones a cada uno de los genes ha concluido, los investigadores en genética molecular pueden agrupar genes de acuerdo con los procesos en los que intervienen (síntesis del DNA, síntesis proteica, generación de ATP, etc.) y deducir qué fracción del genoma está dedicada a cada una de las actividades celulares. El conjunto más numeroso de genes de *E. coli*, *A. thaliana* y *H. sapiens* es el de los genes de función (de momento) desconocida y representa más del 40% en cada una de esas especies. Los transportadores de iones y pequeñas moléculas a través de las membranas plasmáticas suponen una importante proporción de genes en las tres especies, mayor en la bacteria y la planta que en el mamífero (el 10% de los ~4.400 genes de *E. coli*, ~8% de los ~32.000 genes de *A. thaliana* y ~4% de los ~29.000 genes de *H. sapiens*). Los genes que codifican las proteínas y el RNA necesarios para la síntesis proteica representan entre el 3% y el 4% del genoma de *E. coli*, pero en las células más complejas de *A. thaliana* son necesarios más genes para dirigir las proteínas a su localización celular final que para la propia síntesis proteica (aproximadamente el 6% y el 2% del genoma, respectivamente). En general, cuanto más complejo es el organismo, mayor es la proporción de su genoma que codifica genes implicados en la *regulación* de procesos celulares y menor la proporción de los dedicados a los procesos básicos, tales como la generación de ATP y la síntesis de proteínas.

La comparación de genomas tiene una importancia cada vez mayor en la biología y medicina humanas

Los genomas del chimpancé y del ser humano son idénticos en un 99,9% y, a pesar de ello, las diferencias entre las dos especies son muchas. Las relativamente pocas diferencias en dotación genética deben explicar la posesión del lenguaje por parte de los humanos, las extraordinarias cualidades atléticas de los chimpancés y muchísimas diferencias más. La comparación de los genomas permitirá a los investigadores la

identificación de genes que pudieran estar relacionados con las divergencias en los programas de desarrollo de los seres humanos y de otros primates y con la aparición de funciones complejas tales como el lenguaje. La imagen resultante será tanto más clara cuanto mayor sea el número de genomas de primates secuenciados y disponibles para su comparación con el genoma humano.

De manera parecida, las diferencias en la dotación genética entre humanos son ínfimas en comparación con las diferencias entre humanos y chimpancés pero, a pesar de ello, estas diferencias dan cuenta de la variedad entre individuos, como por ejemplo, en la salud y en la susceptibilidad a las enfermedades crónicas. Todavía debemos aprender mucho acerca de la variabilidad secuencial entre humanos y la información genómica disponible transformará los conceptos en el diagnóstico y tratamiento médicos. Podemos esperar que los tratamientos paliativos den paso a remedios curativos en los casos de algunas enfermedades genéticas y que se propongan medidas preventivas cada vez más efectivas relacionadas con la susceptibilidad a enfermedades asociada con ciertos marcadores genéticos concretos. La "historia clínica" de hoy podría ser pronto reemplazada por un "pronóstico clínico". ■

RESUMEN 1.5 Fundamentos evolutivos

- Ciertas mutaciones en la herencia genética dan lugar a organismos mejor adaptados a la supervivencia en un nicho ecológico determinado y a la selección preferente de su progenie. Este proceso de mutación y de selección constituye la base de la evolución darwiniana que ha dado como resultado los organismos existentes en la actualidad a partir de la primera célula y explica la similitud fundamental entre todos los organismos vivos.
- La vida apareció hace aproximadamente 3.500 millones de años, probablemente gracias a la formación de compartimientos rodeados de membrana que contenían moléculas de RNA capaces de autorreplicarse. Los componentes de la primera célula surgieron probablemente como producto de la acción de chimeneas térmicas en los fondos marinos o por acción de las descargas eléctricas y las elevadas temperaturas sobre moléculas atmosféricas sencillas tales como CO_2 y NH_3.
- Las proteínas y el DNA, respectivamente, fueron reemplazando a lo largo del tiempo las funciones catalítica y genética del genoma de RNA primigenio.
- Las células eucarióticas adquirieron la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa de bacterias endosimbióticas. En los organismos multicelulares, líneas celulares diferenciadas se especializan en una o más funciones esenciales para la supervivencia del organismo.
- El conocimiento de las secuencias nucleotídicas genómicas completas de organismos de diferentes ramas del árbol filogenético proporciona datos sobre la evolución y ofrece enormes oportunidades a la medicina humana.

Palabras clave

Todos los términos están definidos en el glosario.

metabolito 3
núcleo 3
genoma 3
eucariota 3
procariota 3
Bacteria 4
Archaea 4
citoesqueleto 8
estereoisómeros 15
configuración 15
centro quiral 16
conformación 18
entropía, *S* 22
entalpía, *H* 22
variación de energía libre, ΔG 22
reacción endergónica 22
reacción exergónica 22
equilibrio 23
variación de energía libre estándar, $\Delta G°$ 24
energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$ 25
catabolismo 25
anabolismo 25
metabolismo 25
biología de sistemas 26
mutación 29

Bibliografía

General

Friedman, H.C. (2004) From *"Butyribacterium"* to *"E. coli"*: an essay on unity in biochemistry. *Perspect. Biol. Med.* **47**, 47–66.

Fruton, J.S. (1999) *Proteins, Enzymes, Genes: The Interplay of Chemistry and Biochemistry*, Yale University Press, New Haven.
Un distinguido historiador de la bioquímica describe el desarrollo de esta ciencia y discute acerca de su impacto en la medicina, la farmacia y la agricultura.

Harold, F.M. (2001) *The Way of the Cell: Molecules, Organisms, and the Order of Life*, Oxford University Press, Oxford.

Judson, H.F. (1996) *The Eighth Day of Creation: The Makers of the Revolution in Biology*, edición ampliada, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
Un relato autorizado y muy interesante sobre la aparición de la bioquímica y la biología molecular en el siglo XX.

Kornberg, A. (1987) The two cultures: chemistry and biology. *Biochemistry* **26**, 6888–6891.
La importancia de aplicar técnicas químicas a problemas biológicos descrita por un eminente investigador.

Monod, J. (1971) *Chance and Necessity*, Alfred A. Knopf, Inc., New York. [Edición en rústica Vintage Books, 1972.] Edición original en francés (1970) *Le hasard et la nécessité*, Editions du Seuil, Paris.
Una exploración de las implicaciones filosóficas del conocimiento biológico.

Morowitz, H.J. (2002) *The Emergence of Everything (How the World Became Complex)*, Oxford University Press, Oxford.
Una discusión corta y bellamente escrita sobre la aparición de organismos complejos a partir de principios simples.

Pace, N.R. (2001) The universal nature of biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 805–808.
Una breve discusión sobre la definición mínima de vida.

Fundamentos celulares

Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., & Hardin, J. (2005) *The World of the Cell*, 6th edn, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City, CA.
Un excelente libro de texto introductorio a la biología celular.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.R., Zipursky, S.L., & Darnell, J. (2004) *Molecular Cell Biology*, 5th edn, W. H. Freeman and Company, New York.
Un texto soberbio, útil para éste y posteriores capítulos.

Purves, W.K., Sadava, D., Heller, H.C., & Orians, G.H. (2003) *Life: The Science of Biology,* 7th edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Fundamentos químicos

Barta, N.S. & Stille, J.R. (1994) Grasping the concepts of stereochemistry. *J. Chem. Educ.* **71**, 20–23.
Una clara descripción del sistema RS de nomenclatura de los estereoisómeros, con consejos prácticos para determinar y recordar la quiralidad de los isómeros.

Vollhardt, K.P.C. & Shore, N.E. (2007) *Química orgánica: Estructura y función,* 5ª ed., Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
Discusiones actualizadas sobre estereoquímica, grupos funcionales, reactividad y la química de las principales clases de biomoléculas.

Fundamentos físicos

Atkins, P.W. & Jones, L. (2005) *Chemical Principles: The Quest for Insight,* 3rd edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Atkins, P.W. & de Paula, J. (2006) *Physical Chemistry for the Life Sciences,* W. H. Freeman and Company, New York.

Blum, H.F. (1968) *Time's Arrow and Evolution,* 3rd edn, Princeton University Press, Princeton.
Excelente discusión sobre la influencia de la segunda ley de la termodinámica en la evolución biológica.

Fundamentos genéticos

Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewinton, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., & Miller, J.H. (2004) *An Introduction to Genetic Analysis,* W. H. Freeman and Company, New York.

Hartwell, L., Hood, L., Goldberg, M.L., Silver, L.M., Veres, R.C., & Reynolds, A. (2003) *Genetics: From Genes to Genomes,* McGraw-Hill, New York.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.

Jacob, F. (1973) *The Logic of Life: A History of Heredity,* Pantheon Books, Inc., New York. Traducción del original (1970) *La logique du vivant: une historie de l'hérédité,* Editions Gallimard, Paris.
Fascinante descripción histórica y filosófica del camino gracias al cual hemos llegado al actual grado de comprensión de la vida a nivel molecular.

Klug, W.S. & Cummings, M.R. (2002) *Concepts of Genetics,* 7th edn, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Pierce, B. (2005) *Genetics: A Conceptual Approach,* 2nd edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Fundamentos evolutivos

Brow, J.R. & Doolittle, W.F. (1997) Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 456–502.
Una completa discusión sobre los argumentos que permiten situar los Arquea en el árbol filogenético que conduce a los organismos multicelulares.

Carroll, S.B. (2005) *Endless Forms Most Beautiful: The New Science of Evo Devo and the Making of the Animal Kingdom,* W.W. Norton & Company, Inc., New York.

Carroll, S.B. (2006) *The Making of the Fittest: DNA and the Ultimate Forensic Record of Evolution,* W.W. Norton & Company, Inc., New York.

de Duve, C. (1995) The beginnings of life on earth. *Am. Sci.* **83**, 428–437.
Explicación de la sucesión de pasos químicos que condujo a los primeros organismos vivos.

de Duve, C. (1996) The birth of complex cells. *Sci. Am.* **274** (April), 50–57.

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**.
Una colección de casi 100 artículos sobre todos los aspectos de la evolución prebiótica y de la evolución biológica primaria; probablemente la mejor referencia sobre evolución molecular.

Gesteland, R.F., Atkins, J.F., & Cech, T.R. (eds). (2006) *The RNA World,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
Una colección de interesantes revisiones sobre un amplio número de temas relacionados con el mundo de RNA.

Lazcano, A. & Miller, S.L. (1996) The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell* **85**, 793–798.
Breve revisión de los progresos recientes en los estudios sobre el origen de la vida: atmósferas primitivas, surgencias submarinas, origen autotrófico frente a origen heterotrófico, los mundos de RNA y pre-RNA y el tiempo requerido para que se originase la vida.

Margulis, L. (1996) Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1071–1076.
Describe los argumentos que justifican la división de los seres vivos en cinco reinos: Monera, Protoctista, Fungi, Animalia, Plantae. (Compárese con el artículo de Woese et al., citado más adelante.)

Margulis, L., Gould, S.J., Schwartz, K.V., & Margulis, A.R. (1998) *Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth,* 3rd edn, W. H. Freeman and Company, New York.
Descripción de los principales grupos de organismos, bellamente ilustrada con micrografías electrónicas y dibujos.

Mayr, E. (1997) *This Is Biology: The Science of the Living World,* Belknap Press, Cambridge, MA.
Una historia del desarrollo de la ciencia, con énfasis especial en la evolución darwiniana y a cargo de un eminente darwinista.

Miller, S.L. (1987) Which organic compounds could have occurred on the prebiotic earth? *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 17–27.
Resumen de los experimentos de laboratorio sobre evolución química, a cargo de la persona que llevó a cabo el experimento original de Miller-Urey.

Woese, C.R. (2002) On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8742–8747.
Una revisión corta y precisa.

Woese, C.R. (2004) A new biology for a new century. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 173–186.
Desarrollo del pensamiento moderno acerca de la evolución celular por uno de los pensadores centrales en el campo.

Woese, C.R., Kandler, O., & Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576–4579.
Describe los argumentos que justifican la división de los seres vivos en tres reinos. (Compárese con el artículo de Margulis (1996) citado antes.)

Problemas

A continuación se proponen algunos problemas relacionados con el contenido del capítulo. (Al resolver los problemas del final de los capítulos puede ser conveniente referirse a las tablas que se encuentran en la contracubierta posterior.) Cada problema recibe un título para facilitar su referencia y discusión. Recuerde que en los problemas numéricos las respuestas deben expresarse con el número adecuado de cifras significativas. En el Apéndice B se encuentran las soluciones abreviadas; las soluciones completas se publican en la *Absolute Ultimate Study Guide to Accompany Principles of Biochemistry.*

1. El tamaño de las células y sus componentes

(a) Si se pudiera hacer crecer una célula 10.000 veces (que es el típico aumento que se consigue con un microscopio), ¿qué tamaño tendría? Se supone que se observa una "típica" célula eucariótica con un diámetro celular de 50 μm.

(b) Si esta célula fuera una célula muscular (miocito), ¿cuántas moléculas de actina podría albergar? (Suponga que la célula muscular es esférica y que no hay otros componentes presentes; las moléculas de actina son esféricas con un diámetro de 3,6 nm. El volumen de una esfera es de $4/3\pi r^3$.)

(c) Si la célula fuera una célula hepática (hepatocito) de las mismas dimensiones, ¿cuántas mitocondrias podría contener? (Suponga que la célula es esférica, que no hay otros componentes presentes y que la mitocondria es esférica con un diámetro de 1,5 μm.)

(d) La glucosa es el principal nutriente energético para la mayoría de células. Suponiendo que está presente en concentraciones de 1 mM, calcule cuántas moléculas de glucosa estarían presentes en la hipotética (y esférica) célula eucariótica. (El número de Avogadro, el número de moléculas en un mol de una sustancia no ionizada, es de $6{,}02 \times 10^{23}$.)

(e) La hexoquinasa es un enzima importante en el metabolismo de la glucosa. Si la concentración de hexoquinasa en nuestra célula eucariota es de 20 μM, ¿cuántas moléculas de glucosa estarán disponibles para ser metabolizadas por cada molécula de hexoquinasa?

2. Componentes de *E. coli* Las células de *E. coli* tienen forma de varilla, con aproximadamente 2 μm de longitud y 0,8 μm de diámetro. El volumen de un cilindro es de $\pi r^2 h$, donde h es la altura del cilindro.

(a) Si la densidad media de *E. coli* (principalmente formada por agua) es de $1{,}1 \times 10^3$ g/L, ¿cuál es el peso de una sola célula?

(b) La pared celular protectora de *E. coli* tiene un grosor de 10 nm. ¿Cuál es el porcentaje del volumen total de la bacteria ocupado por la pared?

(c) *E. coli* es capaz de crecer y multiplicarse rápidamente gracias a la presencia de unos 15.000 ribosomas esféricos (diámetro 18 nm), que llevan a cabo la síntesis de proteínas. ¿Cuál es el porcentaje del volumen celular total ocupado por los ribosomas?

3. Información genética en el DNA de *E. coli* La información genética contenida en el DNA consiste en una secuencia lineal de palabras sucesivas codificadas, denominadas codones. Cada codón es una secuencia específica de tres desoxirribonucleótidos (tres pares de desoxirribonucleótidos en el DNA de doble cadena), y cada codón codifica un único aminoácido en una proteína. La masa molecular de una molécula de DNA de *E. coli* es de aproximadamente $3{,}1 \times 10^9$ g/mol. La masa molecular media de un par de nucleótidos es de 660 g/mol, y cada par de nucleótidos contribuye con 0,34 nm a la longitud del DNA.

(a) Calcule la longitud de una molécula de DNA de *E. coli*. Compare la longitud de la molécula de DNA con las dimensiones reales de la célula (véase problema 2). ¿Cómo puede caber la molécula de DNA en el interior de la célula?

(b) Considere que la proteína promedio de *E. coli* tiene una cadena de 400 aminoácidos. ¿Cuál es el número máximo de proteínas que pueden ser codificadas por una molécula de DNA de *E. coli*?

4. El elevado régimen del metabolismo bacteriano Las células bacterianas tienen un metabolismo mucho más rápido que las células animales. En condiciones ideales, algunas bacterias multiplican su tamaño por dos y se dividen en 20 min, mientras que la mayoría de células animales requieren 24 h en condiciones de crecimiento rápido. El elevado régimen del metabolismo bacteriano exige que la relación entre la superficie celular y su volumen sea grande.

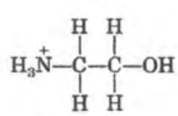
(a) ¿Cuál es la razón de que la relación superficie-volumen tenga efecto sobre la velocidad del metabolismo?

(b) Calcule la relación superficie-volumen para la bacteria esférica *Neisseria gonorrhoeae* (diámetro 0,5 μm), responsable de la enfermedad denominada gonorrea. Compárela con la relación superficie-volumen de una ameba globular, una célula eucariótica de gran tamaño (150 μm de diámetro). El área de una esfera es $4\pi r^2$.

5. Transporte axonal rápido Las neuronas poseen extensiones largas y finas denominadas axones, que son estructuras especializadas que conducen señales a través del sistema nervioso de un organismo. Algunas extensiones axonales pueden tener hasta 2 m, como por ejemplo, los axones que se originan en la médula espinal y terminan en los músculos de los dedos de los pies. Pequeñas vesículas membranosas que transportan materiales esenciales para la función axonal se mueven a lo largo de microtúbulos del citoesqueleto, desde el cuerpo de la célula hasta la punta de los axones. Si la velocidad media de una vesícula es de 1 μm/s, ¿cuánto tiempo tarda una vesícula en moverse desde el cuerpo celular en la médula espinal hasta la punta del axón en los dedos de los pies?

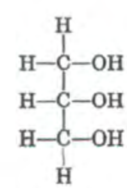
6. ¿Es tan buena la vitamina C sintética como la natural? Los productores de alimentos "sanos" insisten en que las vitaminas obtenidas de fuentes naturales son más saludables que las obtenidas por métodos sintéticos. Se dice, por ejemplo, que el ácido L-ascórbico puro (vitamina C) obtenido del escaramujo es mejor que el ácido L-ascórbico puro obtenido en una planta química. ¿Son diferentes las dos vitaminas? ¿Puede el organismo distinguir la fuente de una vitamina?

7. Identificación de grupos funcionales En las figuras 1–15 y 1–16 se muestran algunos de los grupos funcionales más comunes de las biomoléculas. Es importante saberlos identificar, puesto que las actividades y las propiedades biológicas de las biomoléculas están determinadas en gran parte por sus grupos funcionales. Identifique, rodee con un círculo y nombre cada uno de los grupos funcionales que forman parte de las siguientes moléculas.



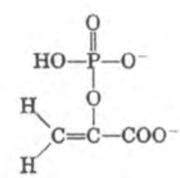
Etanolamina

(a)



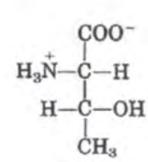
Glicerol

(b)



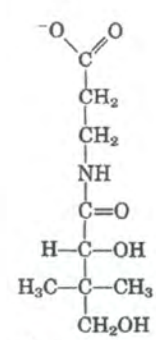
Fosfoenolpiruvato, un intermedio del metabolismo de la glucosa

(c)



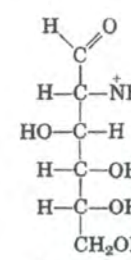
Treonina, un aminoácido

(d)



Pantotenato, una vitamina

(e)

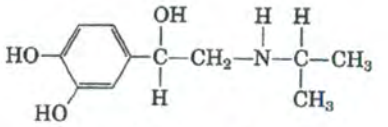


D-Glucosamina

(f)

8. Actividad de fármacos y estereoquímica En ocasiones, las diferencias cuantitativas en la actividad biológica de dos enantiómeros de un compuesto son bastante grandes. Por ejemplo, el isómero D del fármaco isoprotenerol, utilizado en el tratamiento del asma suave, es entre 50 y 80 veces más efectivo como broncodilatador que el isómero L. Identi-

fique el centro quiral del isoprotenerol. ¿Cuál puede ser la causa de que dos enantiómeros posean actividades biológicas tan radicalmente diferentes?

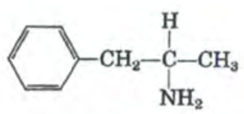


Isoproterenol

9. Separación de biomoléculas Al estudiar una biomolécula particular (una proteína, ácido nucleico, glúcido o lípido) en el laboratorio, el bioquímico necesita en primer lugar separarla del resto de biomoléculas de la muestra, es decir, *purificarla*. Más adelante se considerarán las técnicas específicas de purificación. Sin embargo, considerando simplemente las unidades monoméricas que constituyen las biomoléculas, deberíamos tener algunas ideas sobre qué características de esas biomoléculas nos permitirían separar unas de otras. Por ejemplo, ¿cómo se podrían separar (a) aminoácidos de ácidos grasos y (b) nucleótidos de glucosa?

10. ¿Una vida basada en el silicio? El silicio pertenece al mismo grupo de la tabla periódica que el carbono y, como éste, puede formar hasta cuatro enlaces simples. Se han escrito muchas historias de ciencia ficción sobre la posibilidad de una vida basada en el silicio. ¿Sería esto posible? ¿Qué características del silicio lo hacen *menos* apto que el carbono para actuar como el elemento central organizador de la vida? Para responder a esta pregunta se puede utilizar lo aprendido acerca de la versatilidad de enlace del carbono, además de referirse a un libro de química inorgánica para averiguar las propiedades de enlace del silicio.

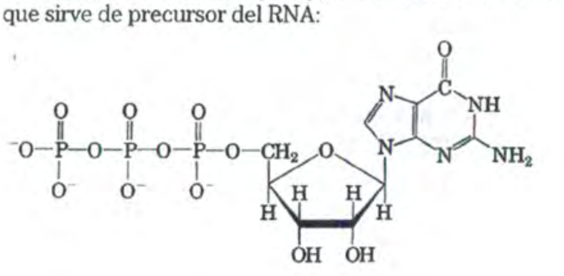
11. Acción farmacológica y estructura molecular Hace algunos años dos compañías farmacéuticas comercializaron un fármaco bajo los nombres comerciales de Dexedrina y Benzedrina. La estructura del compuesto es la siguiente:



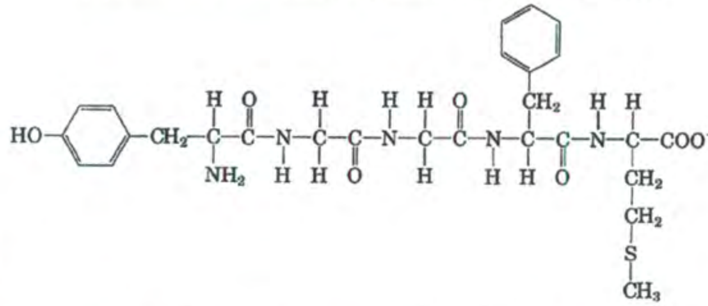
Las propiedades físicas (análisis elemental de C, H y N, punto de fusión, solubilidad, etc.) de la Dexedrina y de la Benzedrina eran idénticas. La dosis oral recomendada de Dexedrina (que todavía se encuentra a la venta) era de 5 mg/día, pero la dosis recomendada de Benzedrina (retirada del mercado) era el doble. Aparentemente hacía falta mucha más Benzedrina que Dexedrina para conseguir la misma respuesta fisiológica. Explique esta contradicción aparente.

12. Componentes de biomoléculas complejas En la figura 1–10 se muestran las estructuras de los principales componentes de biomoléculas complejas. Identifique los constituyentes de cada una de las tres importantes biomoléculas que se muestran a continuación (presentadas en sus formas ionizadas a pH fisiológico).

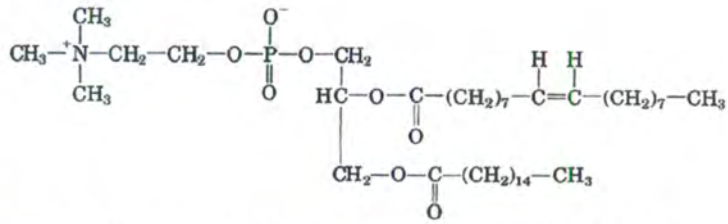
(a) Guanosina trifosfato (GTP), un nucleótido rico en energía que sirve de precursor del RNA:



(b) Metionina-encefalina, el opiáceo endógeno del cerebro:



(c) Fosfatidilcolina, un componente habitual de las membranas celulares:



13. Determinación de la estructura de una biomolécula Se aisló una sustancia desconocida, X, a partir del músculo de conejo. La estructura de X se determinó a partir de los siguientes experimentos y observaciones. Análisis cuantitativos demostraron que X se componía exclusivamente de C, H y O. Se oxidó completamente una muestra de X de peso conocido, y se midieron las cantidades de H_2O y CO_2 producidas. A partir de este análisis cuantitativo, se llegó a la conclusión de que contenía un 40,00% de C, un 6,71% de H y un 53,29% de O en peso. Se determinó la masa molecular de X con un espectrómetro de masas, y resultó ser de 90,00 u (unidades de masa atómica; véase el Recuadro 1-1). Un espectro infrarrojo de X demostró que contenía un enlace doble. X se disolvía rápidamente en agua para dar una disolución ácida. Se ensayó una disolución de X en un polarímetro, observándose que poseía actividad óptica.

(a) Determine la fórmula empírica y molecular de X.

(b) Dibuje las posibles estructuras de X que sean congruentes con la fórmula molecular y contengan un doble enlace. Considérense *tan sólo* estructuras lineales o ramificadas y no estructuras cíclicas. Recuerde que los enlaces del oxígeno consigo mismo son poco estables.

(c) ¿Cuál es el significado estructural de la actividad óptica observada? ¿Qué estructuras de (b) son consistentes con esta observación?

(d) ¿Cuál es el significado estructural de la observación acerca del carácter acídico de una disolución de X? ¿Qué estructuras de (b) son consistentes con esta observación?

(e) ¿Cuál es la estructura de X? ¿Existe más de una estructura consistente con todos los datos aportados?

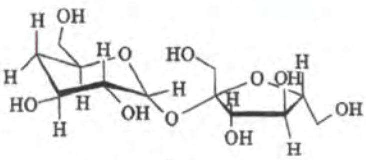
Problema de análisis de datos

14. Moléculas de sabor dulce Muchos compuestos nos saben a dulce. El sabor dulce se percibe cuando una molécula se une a un receptor dulce, un tipo de receptor gustativo, presente en la superficie de ciertas células linguales. Cuanto más fuerte sea la unión, menor será la concentración necesaria para saturar el receptor y más dulce será el sabor percibido a partir de una concentración determinada de esa sustancia. La variación de la energía libre estándar, $\Delta G°$, de la reacción de fijación de la molécula dulce a su receptor se puede medir en kilojoules o kilocalorías por mol.

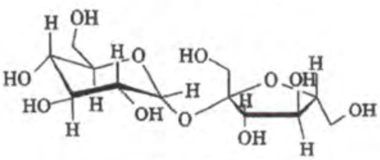
El sabor dulce se puede cuantificar en unidades de "dulzor molar relativo" (MRS, según sus siglas en inglés), que compara el dulzor de una sustancia con respecto al de la sacarosa. La sacarina, por ejemplo, tiene una MRS de 161, lo que significa que la sacarina es 161 veces más dulce que la sacarosa. En términos prácticos, esto se mide en base a la percepción del grado de dulzor que tienen personas voluntarias cuando prueban disoluciones de cada compuesto a diversas concentraciones. La sacarosa y la sacarina saben igualmente dulces cuando la primera está a una concentración 161 veces mayor que la segunda.

(a) ¿Cuál es la relación entre MRS y la $\Delta G°$ de la reacción de unión? De modo más concreto, ¿correspondería una $\Delta G°$ más negativa a un valor mayor o menor de MRS? Razónelo.

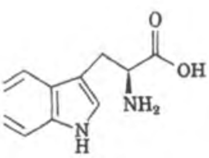
Se muestran a continuación las estructuras de 10 compuestos que tienen sabor dulce. En cada caso se expresan los valores de MRS y de $\Delta G°$ de unión al receptor dulce respectivo.



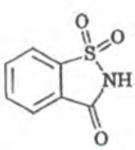
Desoxisacarosa
MRS = 0,95
$\Delta G° = -6{,}67$ kcal/mol



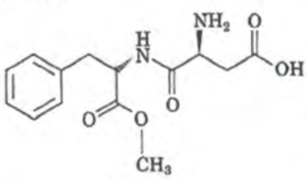
Sacarosa
MRS = 1
$\Delta G° = -6{,}71$ kcal/mol



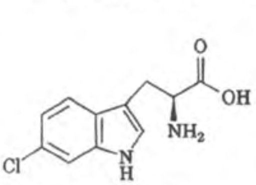
D-Triptófano
MRS = 21
$\Delta G° = -8{,}5$ kcal/mol



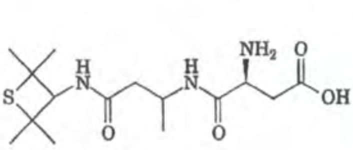
Sacarina
MRS = 161
$\Delta G° = -9{,}7$ kcal/mol



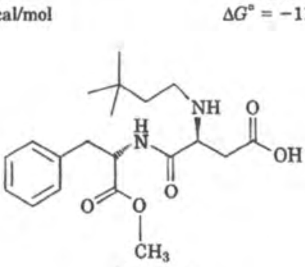
Aspartame
MRS = 172
$\Delta G° = -9{,}7$ kcal/mol



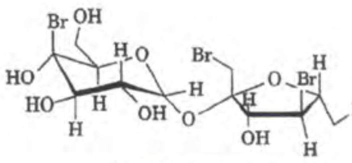
6-Cloro-D-triptófano
MRS = 906
$\Delta G° = -10{,}7$ kcal/mol



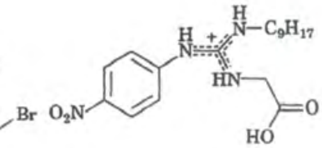
Alitame
MRS = 1.937
$\Delta G° = -11{,}1$ kcal/mol



Neotame
MRS = 11.057
$\Delta G° = -12{,}1$ kcal/mol



Tetrabromosacarosa
MRS = 13.012
$\Delta G° = -12{,}2$ kcal/mol



Ácido sucrónico
MRS = 200.000
$\Delta G° = -13{,}8$ kcal/mol

Morini, Bassoli y Temussi (2005) usaron métodos computacionales (descritos a menudo como métodos "in silico") para modelar la unión de moléculas dulces al receptor dulce.

(b) ¿Por qué son útiles los modelos de ordenador para predecir el dulzor de las moléculas en lugar de los ensayos de sabor en humanos o en animales?

En un trabajo previo, Schallenberger y Acree (1967) sugirieron que todas las moléculas dulces poseían un grupo estructural "AH-B" en el que "A y B son átomos electronegativos separados por una distancia superior a 2,5 Å [0,25 nm] e inferior a 4 Å [0,4 nm]. H es un átomo de hidrógeno unido a uno de los átomos electronegativos por un enlace covalente" (p. 481).

(c) Puesto que la longitud de un enlace simple "típico" es de aproximadamente 0,15 nm, identifique el o los grupos AH-B en cada una de las moléculas anteriores.

(d) En base a sus conclusiones en el ejercicio (c), enuncie dos objeciones a la frase "las moléculas que contienen un grupo AH-B tienen sabor dulce".

(e) El modelo AH-B se *puede* usar con dos de las moléculas mostradas para explicar las diferencias de MRS y $\Delta G°$. ¿Cuáles son esas dos moléculas y cómo las emplearía para justificar el modelo AH-B?

(f) Algunas de las moléculas tienen estructuras muy parecidas pero valores muy diferentes de MRS y $\Delta G°$. Dé dos ejemplos y utilícelos para demostrar que el modelo AH-B no es capaz de explicar las diferencias observadas en dulzor.

En su estudio por ordenador, Morini y colaboradores usaron la estructura tridimensional del receptor dulce y un programa de dinámica molecular llamado GRAMM para predecir la $\Delta G°$ de la unión de las moléculas al receptor. En primer lugar "entrenaron" su modelo, es decir, refinaron los parámetros con el fin de que los valores de $\Delta G°$ predichos por el modelo coincidieran con los valores conocidos de $\Delta G°$ para un grupo de moléculas (el "grupo de entrenamiento"). A continuación "ensayaron" el modelo haciendo que predijera los valores de $\Delta G°$ para un nuevo grupo de moléculas (el "grupo prueba").

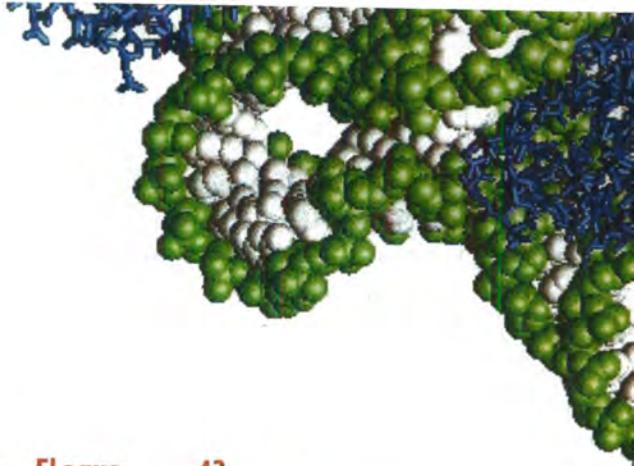
(g) ¿Por qué necesitaron Morini y colaboradores ensayar su modelo frente a un grupo de moléculas diferente del grupo con el que fue entrenado?

(h) Los investigadores hallaron que los valores predichos de $\Delta G°$ para el grupo de prueba diferían de los valores reales una media de 1,3 kcal/mol. Usando los valores dados con las estructuras anteriores, estime el error resultante en los valores de MRS.

Referencias

Morini, G., Bassoli, A., & Temussi, P.A. (2005) From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor. *J. Med. Chem.* **48**, 5520–5529.

Schallenberger, R.S. & Acree, T.E. (1967) Molecular theory of sweet taste. *Nature* **216**, 480–482.



PARTE I

ESTRUCTURA Y CATÁLISIS

La bioquímica no es otra cosa que la química de la vida: sí, es posible investigar, analizar y comprender la vida. Para empezar, todo estudiante de bioquímica necesita un lenguaje y algunos fundamentos básicos; son los que se ven en la Parte I.

Los capítulos de la Parte I se dedican a la estructura y función de las principales clases de componentes celulares: el agua (Capítulo 2), los aminoácidos y las proteínas (Capítulos 3 a 6), los azúcares y los polisacáridos (Capítulo 7), los nucleótidos y los ácidos nucleicos (Capítulo 8), los ácidos grasos y los lípidos (Capítulo 10) y, finalmente, las membranas y las proteínas señalizadoras de membrana (Capítulos 11 y 12). Estos temas dedicados a las moléculas contienen información suplementaria acerca de las tecnologías usadas para estudiarlas. A lo largo del texto se han integrado secciones técnicas, y uno de los capítulos (Capítulo 9) se dedica enteramente a las tecnologías asociadas con el clonaje, la genómica y la proteómica.

Empezaremos, en el Capítulo 2, con el agua, porque sus propiedades afectan la estructura y la función de todos los demás constituyentes celulares. Para cada clase de molécula orgánica estudiaremos en primer lugar la estructura covalente de sus unidades monoméricas (aminoácidos, monosacáridos, nucleótidos y ácidos grasos) para pasar luego a describir las estructuras de las macromoléculas y complejos supramoleculares derivados de ellas. Un aspecto constantemente presente es que las macromoléculas poliméricas de los sistemas vivos, aunque de gran tamaño, son entidades químicas muy ordenadas con secuencias específicas de las subunidades monoméricas, lo que da lugar a estructuras y funciones discretas. Este aspecto fundamental se puede descomponer en tres principios interrelacionados: (1) la estructura única de cada macromolécula determina su función; (2) las interacciones no covalentes juegan un papel crítico en la estructura y por tanto en la función de las macromoléculas, y (3) las subunidades monoméricas en las macromoléculas poliméricas están dispuestas según secuencias específicas, lo que representa una forma de información de la que depende el estado vivo ordenado.

La relación entre estructura y función es especialmente evidente en las proteínas, que muestran una extraordi-

naria diversidad de funciones. Una secuencia polimérica concreta de aminoácidos produce una estructura fibrosa resistente como la que se encuentra en el cabello y en la lana; otra secuencia da lugar a una proteína que transporta oxígeno en la sangre; una tercera se une a otras proteínas y cataliza la rotura de los enlaces entre sus aminoácidos. De modo parecido se pueden entender las funciones especiales de los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos como la consecuencia directa de su estructura química, con sus subunidades monoméricas características unidas en polímeros funcionales precisos. Los azúcares enlazados entre sí se transforman en almacenes de energía, en fibras estructurales y en puntos de reconocimiento molecular específico; los nucleótidos encadenados en el DNA o RNA contienen las instrucciones para la construcción de un organismo completo; y los lípidos agregados forman las membranas. En el Capítulo 12 se unifica la discusión sobre las funciones de las biomoléculas, describiendo la manera en que los sistemas de señalización específicos regulan las actividades de las biomoléculas dentro de una célula, dentro de un órgano y entre órganos para mantener un organismo en homeostasis.

A medida que pasamos de unidades monoméricas a polímeros cada vez mayores, el énfasis en los aspectos químicos se desplaza desde los enlaces covalentes a las interacciones no covalentes. Los enlaces covalentes, tanto a nivel monomérico como macromolecular, imponen restricciones sobre la forma adoptada por las biomoléculas grandes. Son, sin embargo, las numerosas interacciones no covalentes las que dictan la conformación nativa estable de las moléculas grandes a la vez que permiten la flexibilidad necesaria para su función biológica. Como veremos, las interacciones no covalentes son esenciales para que los enzimas manifiesten su poder catalítico, para la interacción específica de los pares de bases complementarios en los ácidos nucleicos, el ordenamiento y propiedades de los lípidos en las membranas. El principio de que las secuencias de unidades monoméricas son ricas en información aparece de manera clara en la discusión de los ácidos nucleicos (Capítulo 8). No obstante, las proteínas y algunos polímeros cortos de azúcares (oligosacáridos) también son moléculas ricas en información. La secuencia de aminoácidos es una forma de información que dirige el plegamiento de la proteína hacia su estructura tridimensional única y, en último término, determina la función de la misma. Algunos oligosacáridos también tienen secuencias y estructuras tridimensionales únicas que pueden ser reconocidas por otras macromoléculas.

Para cada clase de moléculas encontramos una jerarquía estructural similar: subunidades de estructura determinada se conectan mediante enlaces de flexibilidad limitada formando macromoléculas de estructura tridimensional determinada por interacciones no covalentes. Estas macromoléculas interaccionan a su vez para formar las estructuras supramoleculares y los orgánulos que permiten a una célula llevar a cabo sus numerosas funciones metabólicas. En su conjunto las moléculas descritas en la Parte I son el material de la vida.

> Creo que con la progresiva aplicación de los métodos de la química estructural a los problemas fisiológicos, observaremos que la importancia del enlace de hidrógeno en fisiología es mayor que la de cualquier otra característica estructural.
>
> —*Linus Pauling,* The Nature of the Chemical Bond, *1939*

2

El agua

El agua es la sustancia más abundante en los sistemas vivos y constituye el 70% o más del peso de la mayoría de organismos. Los primeros organismos vivos de la Tierra aparecieron en un entorno acuoso, y el curso de la evolución ha sido moldeado por las propiedades del medio acuoso en que se inició la vida.

Este capítulo se inicia con la descripción de las propiedades físicas y químicas del agua, a las que se adaptan todas las características de la estructura y función celulares. Las fuerzas de atracción entre las moléculas de agua y la débil tendencia del agua a ionizarse tienen una importancia crucial para la estructura y función de las biomoléculas. Trataremos el tema de la ionización en términos de constantes de equilibrio, pH y curvas de titulación, y consideraremos la forma en la que las soluciones acuosas de ácidos o bases débiles y de sus sales actúan como tampones contra los cambios de pH en los sistemas biológicos. La molécula de agua y sus productos de ionización, H^+ y OH^-, influyen de manera profunda sobre la estructura, autoensamblaje y propiedades de los componentes celulares, incluidos proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Las interacciones no covalentes responsables de la fuerza y de la especificidad de "reconocimiento" entre las biomoléculas están influidas de manera decisiva por las propiedades disolventes del agua, entre las que se incluye su capacidad para formar enlaces de hidrógeno consigo misma y con los solutos.

2.1 Interacciones débiles en los sistemas acuosos

Los enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua proporcionan las fuerzas de cohesión que hacen que el agua sea líquida a temperatura ambiente y que favorecen el extremo ordenamiento de las moléculas, típico del agua cristalina (hielo). Las biomoléculas polares se disuelven fácilmente en el agua porque pueden reemplazar las interacciones agua-agua por interacciones agua-soluto energéticamente más favorables. Por el contrario, las biomoléculas apolares interfieren con las interacciones agua-agua pero no son capaces de formar interacciones agua-soluto. En consecuencia, las moléculas apolares son muy poco solubles en agua. En soluciones acuosas, las moléculas apolares tienden a agruparse entre sí. Los enlaces iónicos y de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas (del griego, "temor al agua") y de van der Waals, son individualmente débiles, pero colectivamente tienen una influencia muy significativa sobre la estructura tridimensional de las proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos de membrana.

Los enlaces de hidrógeno confieren al agua sus propiedades extraordinarias

El agua tiene un punto de fusión, un punto de ebullición y un calor de vaporización más elevados que la mayoría de disolventes comunes (Tabla 2–1). Estas propiedades extraordinarias del agua son consecuencia de la atracción entre moléculas de agua adyacentes, lo que confiere al agua líquida una gran cohesión interna. La estructura electrónica de la molécula de H_2O permite deducir la causa de estas fuerzas de atracción intermolecular.

Cada átomo de hidrógeno de una molécula de agua comparte un par electrónico con el átomo de oxígeno central. La geometría de la molécula de agua está dictada por las formas de los orbitales electrónicos externos del átomo de oxígeno, que son similares a los orbitales de enlace del carbono sp^3 (véase la Fig. 1–14). Estos orbitales describen aproximadamente un tetraedro, con un átomo de hidrógeno en dos vértices y electrones sin compartir en los otros dos **(Fig. 2–1a)**. El ángulo del enlace H—O—H es de 104,5°, ligeramente menos que los 109,5° de un tetraedro perfecto a causa de la compresión causada por los orbitales no enlazantes del átomo de oxígeno.

El núcleo del oxígeno atrae electrones más fuertemente que el núcleo del hidrógeno (un protón); es decir, el oxígeno es más electronegativo. Esto significa que los electrones compartidos se sitúan con mayor frecuencia cerca del átomo del oxígeno

TABLA 2–1 Punto de fusión, punto de ebullición y calor de vaporización de algunos disolventes comunes

	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Calor de vaporización (J/g)*
Agua	0	100	2.260
Metanol (CH_3OH)	−98	65	1.100
Etanol (CH_3CH_2OH)	−117	78	854
Propanol ($CH_3CH_2CH_2OH$)	−127	97	687
Butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OH$)	−90	117	590
Acetona (CH_3COCH_3)	−95	56	523
Hexano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$)	−98	69	423
Benceno (C_6H_6)	6	80	394
Butano ($CH_3(CH_2)_2CH_3$)	−135	−0,5	381
Cloroformo ($CHCl_3$)	−63	61	247

*La energía calórica necesaria para convertir 1,0 g de un líquido en su punto de ebullición, a presión atmosférica, en su estado gaseoso a la misma temperatura. Es una medida directa de la energía requerida para superar las fuerzas de atracción entre las moléculas en la fase líquida.

que del de hidrógeno. El resultado de esta forma desigual de compartir los electrones es la formación de dos dipolos eléctricos en la molécula de agua, a lo largo de cada uno de los enlaces H—O; cada hidrógeno es portador de una carga positiva parcial (δ^+) y el átomo de oxígeno es portador de una carga negativa parcial igual a la suma de las dos cargas positivas parciales ($2\delta^-$). Como resultado de ello, existe una atracción electrostática entre el átomo de oxígeno de una molécula de agua y el hidrógeno de otra (Fig. 2–1b), que se denomina **enlace de hidrógeno.** A lo largo de este libro, representaremos los enlaces de hidrógeno mediante tres líneas paralelas de color azul, como en la Figura 2–1b.

Los enlaces de hidrógeno son relativamente débiles. Los que se encuentran en agua líquida tienen una **energía de disociación de enlace** (la energía requerida para romper un enlace) de aproximadamente 23 kJ/mol, en comparación con los 470 kJ/mol del enlace covalente O—H en el agua o de los 348 kJ/mol del enlace covalente C—C. El enlace de hidrógeno es alrededor de un 10% covalente debido a los solapamientos en los orbitales enlazantes y alrededor de 90% electrostático. A temperatura ambiente, la energía térmica de una solución acuosa (la energía cinética del movimiento de los átomos y moléculas individuales) es del mismo orden de magnitud que la necesaria para romper los enlaces de hidrógeno. Cuando se calienta el agua, el incremento de temperatura es un reflejo del movimiento más rápido de las moléculas individuales del agua. En cualquier momento, la mayoría de moléculas en el agua líquida están unidas por enlaces de hidrógeno, pero el tiempo de vida de cada uno de ellos es tan sólo de entre 1 a 20 picosegundos (1 ps = 10^{-12} s); al romperse un enlace de hidrógeno se forma otro, con la misma molécula o con otra, en el lapso de 0,1 ps. Se usa el término "agrupaciones fluctuantes" (*flickering clusters*) para referirse a las agrupaciones de corta duración de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno en el agua líquida. La suma de todos los enlaces de hidrógeno entre moléculas de H_2O confiere gran cohesión interna al agua líquida. Las redes extensas de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno forman también puentes de conexión entre solutos (proteínas y ácidos nucleicos, por ejemplo) que permiten que las moléculas de mayor tamaño interaccionen entre ellas a través de distancias de varios nanómetros sin necesidad de entrar en contacto físico.

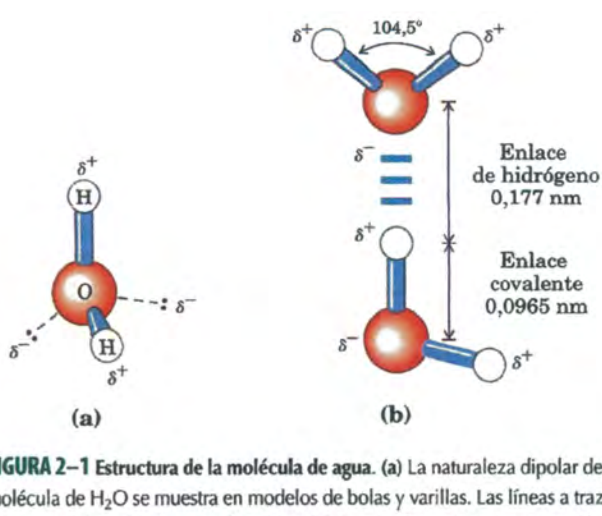


FIGURA 2–1 Estructura de la molécula de agua. **(a)** La naturaleza dipolar de la molécula de H_2O se muestra en modelos de bolas y varillas. Las líneas a trazos representan los orbitales no enlazantes. Existe un ordenamiento casi tetraédrico de los pares de electrones de la capa externa alrededor del átomo de oxígeno; los dos átomos de hidrógeno tienen cargas parciales positivas localizadas (δ^+) y el átomo de oxígeno tiene una carga parcial negativa (δ^-). **(b)** Dos moléculas de H_2O unidas por un enlace de hidrógeno (simbolizado aquí y a lo largo de este libro mediante tres líneas azules) entre el átomo de oxígeno de la molécula superior y un átomo de hidrógeno de la inferior. Los enlaces de hidrógeno son más largos y más débiles que los enlaces O—H covalentes.

El ordenamiento casi tetraédrico de los orbitales alrededor del átomo de oxígeno (Fig. 2–1a) permite que cada molécula de agua forme enlaces de hidrógeno con hasta cuatro moléculas de agua vecinas. Sin embargo, en el agua líquida a temperatura ambiente y presión atmosférica, las moléculas de agua están desorganizadas y en movimiento continuo, de forma que cada molécula forma enlaces de hidrógeno con un promedio de otras 3,4 moléculas solamente. Por el contrario, en el hielo cada molécula de agua está fija en el espacio y forma enlaces de hidrógeno con otras cuatro moléculas de agua formando una estructura reticular regular **(Fig. 2–2)**. La rotura de un número de enlaces de hidrógeno suficiente para desestabilizar la retícula cristalina del hielo requiere mucha energía térmica, lo que

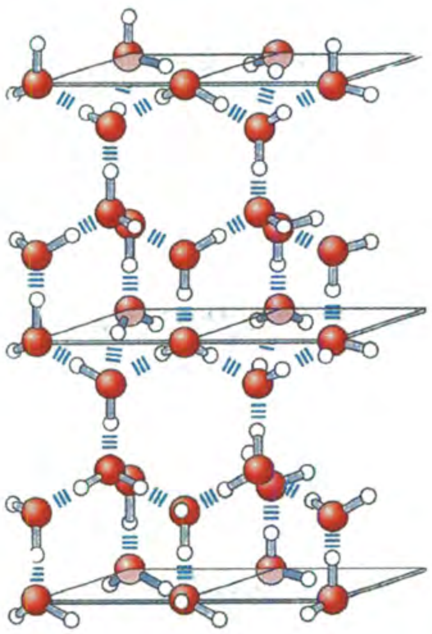


FIGURA 2–2 Enlaces de hidrógeno en el hielo. Cada molécula de agua forma en el hielo cuatro enlaces de hidrógeno, el máximo posible, creando una red cristalina regular. Por el contrario, en el agua líquida a temperatura ambiente y presión atmosférica cada molécula de agua forma enlaces de hidrógeno con otras 3,4 moléculas de agua en promedio. La red cristalina del hielo ocupa más espacio que el ocupado en el agua líquida; el hielo es, así, menos denso que el agua líquida y por eso flota.

explica el punto de fusión relativamente elevado del agua (Tabla 2–1). Cuando se funde el hielo o se evapora el agua, se absorbe calor por parte del sistema:

$$H_2O\text{ (sólido)} \rightarrow H_2O\text{ (líquido)} \qquad \Delta H = +5{,}9\text{ kJ/mol}$$

$$H_2O\text{ (líquido)} \rightarrow H_2O\text{ (gas)} \qquad \Delta H = +44{,}0\text{ kJ/mol}$$

Durante la fusión o la evaporación aumenta la entropía del sistema acuoso a medida que conjuntos altamente ordenados de moléculas de agua se relajan para dar paso a los conjuntos de enlaces de hidrógeno menos ordenados del agua líquida o a las moléculas totalmente desordenadas de agua en el estado gaseoso. A temperatura ambiente, tanto la fusión del hielo como la evaporación del agua se dan espontáneamente; la tendencia de las moléculas de agua a asociarse mediante enlaces de hidrógeno queda contrarrestada por el empuje energético hacia el desorden. Recuérdese que el cambio de energía libre (ΔG) ha de tener un valor negativo para que un proceso se produzca de forma espontánea: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$, en donde ΔG representa la fuerza motriz, ΔH el cambio de entalpía relacionado con la rotura y formación de enlaces y ΔS la variación en el grado de desorden. Dado que ΔH es positivo para la fusión y para la evaporación, es claramente el aumento de entropía (ΔS) el que hace que ΔG sea negativo e impulse estas transformaciones.

El agua forma enlaces de hidrógeno con los solutos polares

Los enlaces de hidrógeno no son exclusivos del agua. Se forman fácilmente entre un átomo electronegativo (el aceptor de hidrógeno, normalmente oxígeno o nitrógeno) y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo (el dador de hidrógeno) en la misma o en otra molécula **(Fig. 2–3)**.

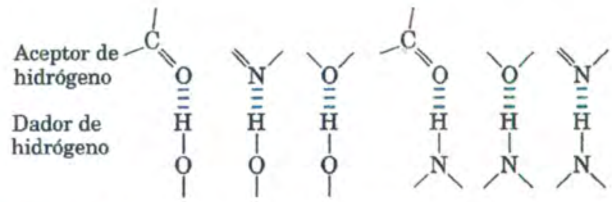


FIGURA 2–3 Tipos comunes de enlaces de hidrógeno en los sistemas biológicos. El aceptor de hidrógeno es usualmente el oxígeno o el nitrógeno; el dador de hidrógeno es otro átomo electronegativo.

Los átomos de hidrógeno unidos covalentemente a átomos de carbono no participan en la formación de enlaces de hidrógeno, puesto que el carbono es tan sólo ligeramente más electronegativo que el hidrógeno y, por tanto, el enlace C—H es sólo muy débilmente polar. Esta diferencia explica por qué el butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OH$) tiene un punto de ebullición relativamente alto de 117 °C, mientras que el butano ($CH_3(CH_2)_2CH_3$) tiene un punto de ebullición de solamente –0,5 °C. El butanol tiene un grupo hidroxilo polar, por lo que puede formar enlaces de hidrógeno intermoleculares. Las biomoléculas no cargadas pero polares tales como los azúcares se disuelven fácilmente en el agua debido al efecto estabilizador de los enlaces de hidrógeno que se forman entre los grupos hidroxilo o el oxígeno carbonílico del azúcar y las moléculas polares de agua. Los alcoholes, los aldehídos, las cetonas y los compuestos que contienen enlaces N—H forman enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua **(Fig. 2–4)** y tienden a ser solubles en agua.

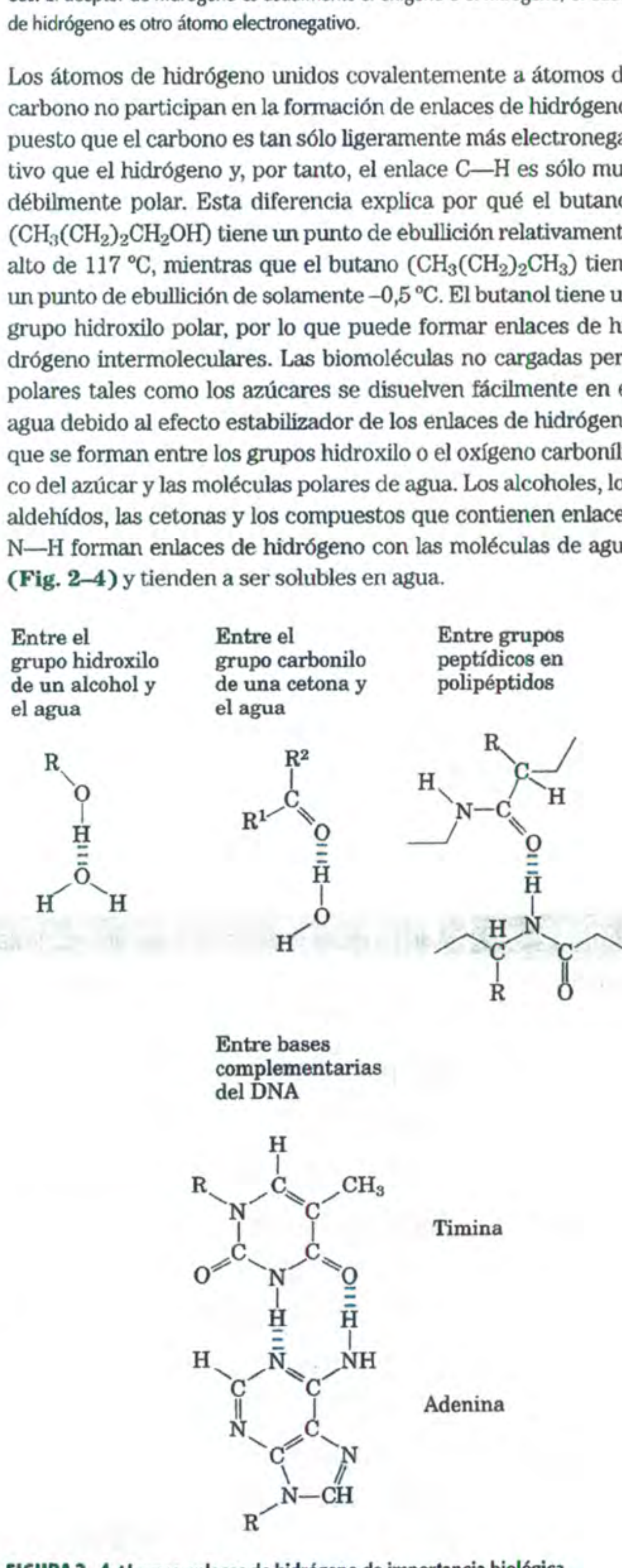


FIGURA 2–4 Algunos enlaces de hidrógeno de importancia biológica.

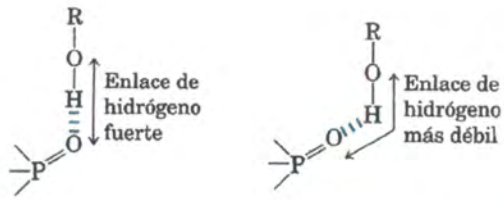


FIGURA 2–5 Direccionalidad del enlace de hidrógeno. La atracción entre las cargas eléctricas parciales (véase la Fig. 2–1) es máxima cuando los tres átomos implicados (en este caso O, H y O) se hallan en línea recta. Cuando los grupos unidos por enlace de hidrógeno sufren restricciones estructurales (como por ejemplo cuando forman parte de una única molécula de proteína), esta geometría ideal puede no ser posible y el enlace de hidrógeno resultante es más débil.

Los enlaces de hidrógeno son más fuertes cuando las moléculas unidas están orientadas de forma que la interacción electrostática sea lo mayor posible, lo que tiene lugar cuando el átomo de hidrógeno y los dos átomos que lo comparten se encuentran en línea recta, esto es, cuando el átomo aceptor está alineado con el enlace covalente entre el átomo dador y el H **(Fig. 2–5)**, lo que sitúa la carga positiva del ión hidrógeno directamente entre las dos cargas parciales negativas. Los enlaces de hidrógeno tienen pues un carácter altamente direccional y son capaces de mantener dos moléculas o grupos unidos por enlace de hidrógeno con un ordenamiento geométrico específico. Veremos más adelante que esta propiedad de los enlaces de hidrógeno confiere estructuras tridimensionales muy precisas a aquellas moléculas de proteínas y ácidos nucleicos en las que existen muchos enlaces de hidrógeno intramoleculares.

El agua interacciona electrostáticamente con los solutos cargados

El agua es un disolvente polar. Disuelve fácilmente la mayoría de biomoléculas, que generalmente son compuestos cargados o polares (Tabla 2–2); los compuestos que se disuelven fácilmente en el agua son **hidrofílicos** (del griego, "atraído por el agua"). Por el contrario, los disolventes apolares tales como el cloroformo y el benceno son malos disolventes de las biomoléculas polares, pero disuelven fácilmente las que son **hidrofóbicas** (moléculas apolares tales como los lípidos y las ceras).

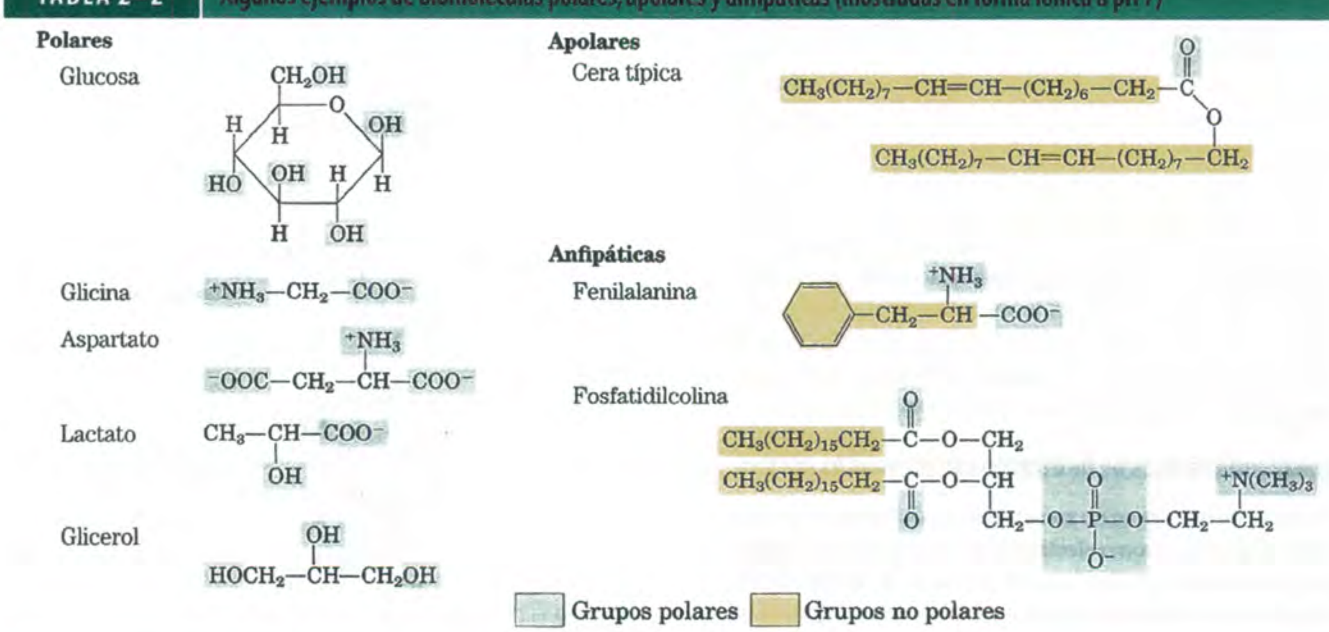
El agua disuelve las sales tales como el NaCl mediante la hidratación y estabilización de los iones Na^+ y Cl^-, debilitando las interacciones electrostáticas entre ellos y contrarrestando así su tendencia a asociarse en una red cristalina **(Fig. 2–6)**. Los mismos factores son aplicables a las biomoléculas cargadas, compuestos con grupos funcionales tales como los ácidos carboxílicos ionizados ($—COO^-$), las aminas protonadas ($—NH_3^+$) y los ésteres o anhídridos fosfato. El agua disuelve fácilmente estos compuestos reemplazando enlaces de hidrógeno soluto-soluto por enlaces de hidrógeno soluto-agua, apantallando así las interacciones electrostáticas entre moléculas del soluto.

El agua apantalla de manera efectiva las interacciones electrostáticas entre iones disueltos a causa de su elevada constante dieléctrica, una propiedad física que refleja el número de dipolos en un disolvente. La intensidad o fuerza (F), de las interacciones iónicas en una disolución depende de la magnitud de las cargas (Q), la distancia entre los grupos cargados (r) y la constante dieléctrica (ε, que no tiene dimensiones) del disolvente en el que tienen lugar las interacciones:

$$F = \frac{Q_1Q_2}{\varepsilon r^2}$$

Para el agua a 25 °C, ε tiene un valor de 78,5 mientras que para el benceno, que es un disolvente muy apolar, ε vale 4,6. Así, las interacciones iónicas son mucho más fuertes en los ambientes menos polares. La dependencia respecto a r^2 hace que las atracciones o repulsiones iónicas operen sólo a distancias muy cortas, del orden de 10 a 40 nm (según la concentración de electrolito) cuando el disolvente es el agua.

TABLA 2–2 Algunos ejemplos de biomoléculas polares, apolares y anfipáticas (mostradas en forma iónica a pH 7)



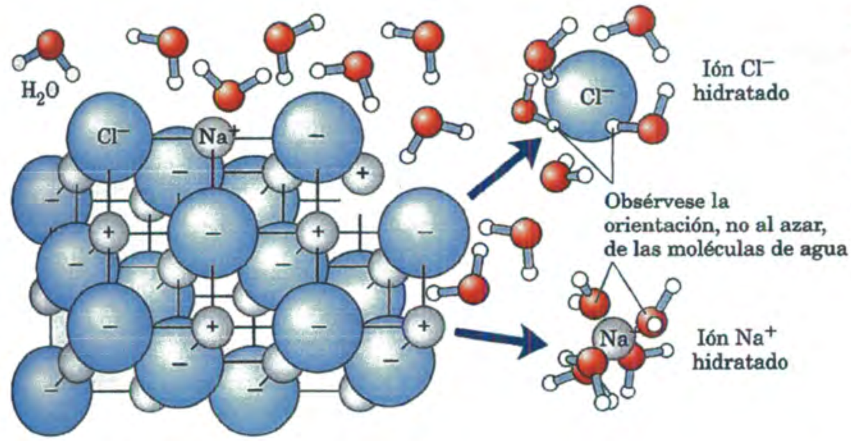


FIGURA 2–6 El agua como disolvente. El agua disuelve muchas sales cristalinas hidratando los iones que las componen. La red cristalina del NaCl se destruye a medida que moléculas de agua se agrupan alrededor de los iones Cl^- y Na^+. Las cargas iónicas son así parcialmente neutralizadas y se debilitan las atracciones electrostáticas necesarias para la formación de la red.

La entropía aumenta cuando se disuelve una sustancia cristalina

A medida que una sal tal como el NaCl se disuelve, los iones Na^+ y Cl^- que abandonan la red cristalina adquieren una libertad de movimiento mucho mayor (Fig. 2–6). El incremento de entropía que se produce en el sistema es el principal responsable de la facilidad con la que sales tales como el NaCl se disuelven en agua. En términos termodinámicos, la disolución tiene lugar con un cambio favorable en la energía libre: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$, en donde ΔH tiene un valor positivo pequeño y $T\,\Delta S$ un valor positivo alto, de forma que ΔG es negativo.

Los gases apolares se disuelven mal en el agua

Los gases biológicamente importantes tales como el CO_2, O_2 y N_2, son apolares. En el O_2 y N_2 ambos átomos comparten los electrones de igual manera. En el CO_2, cada enlace C═O es polar, pero los dos dipolos están dirigidos de manera opuesta, con lo que se anulan entre sí (Tabla 2–3). El movimiento de estas moléculas desde la fase gaseosa desordenada a la fase acuosa restringe su movimiento y el movimiento de las moléculas de agua y representa, por tanto, un descenso de entropía. La naturaleza apolar de estos gases y la disminución de entropía cuando se introducen en la disolución hacen que sean muy poco solubles en agua (Tabla 2–3). Algunos organismos contienen "proteínas transportadoras" hidrosolubles (hemoglobina y mioglobina, por ejemplo) que facilitan el transporte del O_2. El dióxido de carbono forma ácido carbónico (H_2CO_3) en disolución acuosa y es transportado en forma de ión bicarbonato (HCO_3^-), ya sea en forma libre, el bicarbonato es muy soluble en agua (~100g/L a 25 °C), o unido a hemoglobina. Otros tres gases, NH_3, NO y H_2S, también tienen papeles biológicos en algunos organismos; éstos son gases polares que se disuelven fácilmente en el agua y se ionizan en disolución acuosa.

Los compuestos apolares fuerzan cambios energéticamente desfavorables en la estructura del agua

Cuando se mezcla el agua con benceno o hexano, se forman dos fases; ninguno de los dos líquidos es soluble en el otro. Los compuestos apolares tales como el benceno y el hexano son hidrófobicos: son incapaces de experimentar interacciones energéticamente favorables con las moléculas de agua y, de hecho, interfieren en la formación de enlaces de hidrógeno entre mo-

TABLA 2–3 Solubilidad de algunos gases en agua

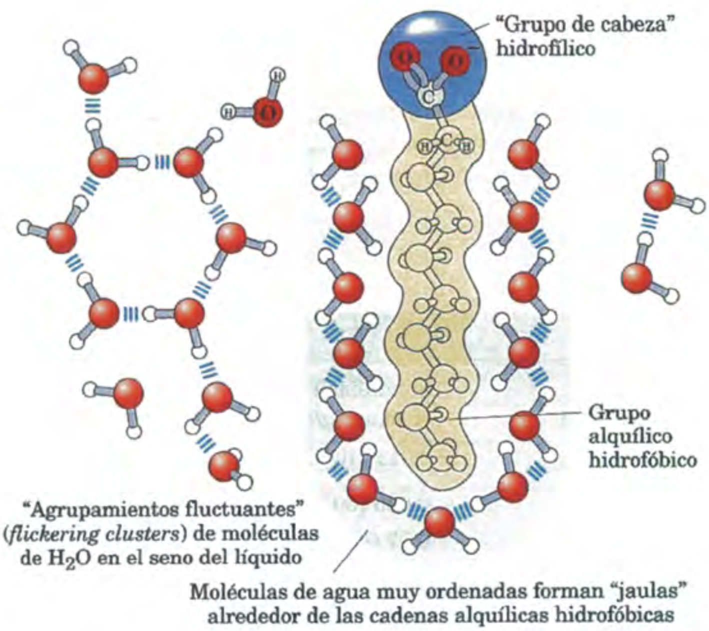
Gas	Estructura*	Polaridad	Solubilidad en agua (g/L)†
Nitrógeno	N≡N	Apolar	0,018 (40 °C)
Oxígeno	O═O	Apolar	0,035 (50 °C)
Dióxido de carbono	$\overset{\delta^-}{\leftarrow}$ $\overset{\delta^-}{\rightarrow}$ O═C═O	Apolar	0,97 (45 °C)
Amoníaco	H–N(–H)–H, δ⁻	Polar	900 (10 °C)
Sulfuro de hidrógeno	H–S–H, δ⁻	Polar	1.860 (40 °C)

*Las flechas representan dipolos eléctricos; existe una carga negativa parcial (δ^-) en la punta de la flecha y una carga parcial positiva (δ^+; no mostrada aquí) en la cola.

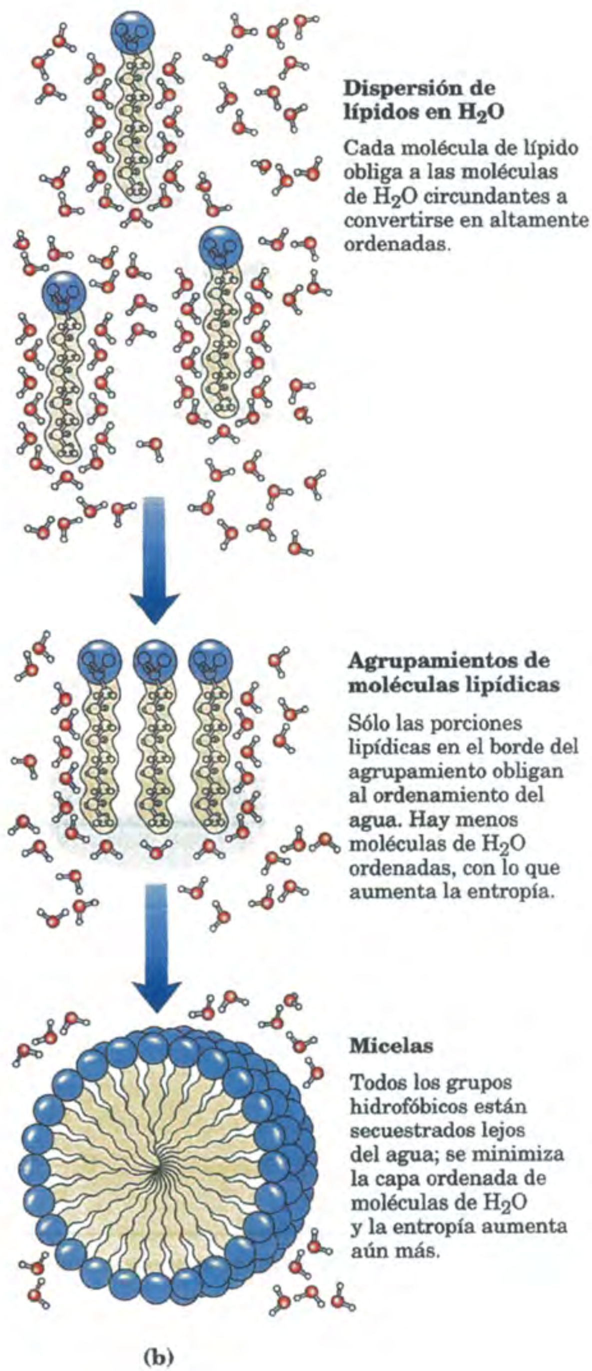
†Obsérvese que las moléculas polares se disuelven mucho mejor incluso a temperaturas bajas que las moléculas apolares a temperaturas relativamente elevadas.

léculas de agua. Todas las moléculas o iones en disolución acuosa interfieren con los enlaces de hidrógeno de algunas moléculas de agua en su proximidad inmediata, pero los solutos cargados o polares (tales como el NaCl) compensan esta pérdida de enlaces de hidrógeno agua-agua mediante la formación de nuevas interacciones entre el soluto y el agua. El cambio neto de entalpía (ΔH) en la disolución de estas sustancias es, generalmente, pequeño. Los solutos hidrofóbicos no ofrecen esta compensación por lo que su adición al agua puede resultar, por tanto, en una pequeña ganancia de entalpía; la rotura de enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua toma energía del sistema por lo que es necesario adquirir energía del entorno. Además de requerir esta entrada de energía, la disolución de solutos hidrofóbicos en el agua da lugar a un descenso significativo de entropía. Las moléculas de agua en la vecindad inmediata de un soluto apolar están restringidas en sus orientaciones posibles ya que forman una capa en forma de jaula de moléculas de agua muy ordenada alrededor de cada molécula de soluto. Estas moléculas de agua no están tan altamente orientadas como las de los **clatratos,** compuestos cristalinos de un soluto apolar y agua, pero el efecto es el mismo en ambos casos: el orden en las moléculas de agua reduce la entropía. El número de moléculas de agua ordenadas, y por tanto la magnitud del descenso de entropía, es proporcional al área superficial del soluto hidrofóbico incluido en la jaula de moléculas de agua. El cambio de energía libre que conlleva la disolución de un soluto apolar en agua es, por tanto, desfavorable: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$, donde ΔH tiene un valor positivo, ΔS un valor negativo, y ΔG es positivo.

Los compuestos **anfipáticos** contienen regiones que son polares (o cargadas) y regiones que son apolares (Tabla 2–2). Cuando se mezcla un compuesto anfipático con agua, la región polar hidrofílica interacciona favorablemente con el disolvente y tiende a disolverse, pero la región apolar hidrofóbica tiende a evitar el contacto con el agua **(Fig. 2–7a)**. Las regiones apolares de las moléculas se agrupan para presentar la menor área hidrofóbica posible al disolvente acuoso, mientras que las regiones polares se disponen de forma que se maximice su interacción con el disolvente (Fig. 2–7b). Estas estructuras estables de compuestos anfipáticos en agua, denominadas **micelas,** pueden contener cientos o miles de moléculas. Las fuerzas que mantienen juntas las regiones apolares de las mo-



(a)



(b)

FIGURA 2–7 Compuestos anfipáticos en disolución acuosa. **(a)** Los ácidos grasos de cadena larga tienen cadenas alquílicas muy hidrofóbicas, cada una de las cuales está rodeada por una capa de moléculas de agua altamente ordenadas. **(b)** Agrupándose en micelas, las moléculas de ácido graso exponen al agua la mínima superficie hidrofóbica posible y se necesitan menos moléculas de agua en la capa de agua ordenada. La micela se estabiliza gracias a la energía ganada en la liberación de moléculas de agua inmovilizadas.

léculas se denominan **interacciones hidrofóbicas.** La fuerza de estas interacciones no se debe a ninguna atracción intrínseca entre las partes apolares. Proviene más bien de la obtención de la máxima estabilidad termodinámica del sistema al minimizar el número de moléculas de agua ordenadas necesarias para rodear porciones hidrofóbicas de las moléculas de soluto.

Muchas biomoléculas son anfipáticas; las proteínas, los pigmentos, ciertas vitaminas y los esteroles y fosfolípidos de las membranas tienen regiones con superficies polares y apolares. Las estructuras formadas por estas moléculas se estabilizan mediante interacciones hidrofóbicas entre las regiones apolares. Las interacciones hidrofóbicas entre lípidos y entre lípidos y proteínas son los determinantes más importantes de la estructura de las membranas biológicas. Las interacciones hidrofóbicas entre aminoácidos apolares estabilizan también los patrones de plegamiento tridimensional de las proteínas.

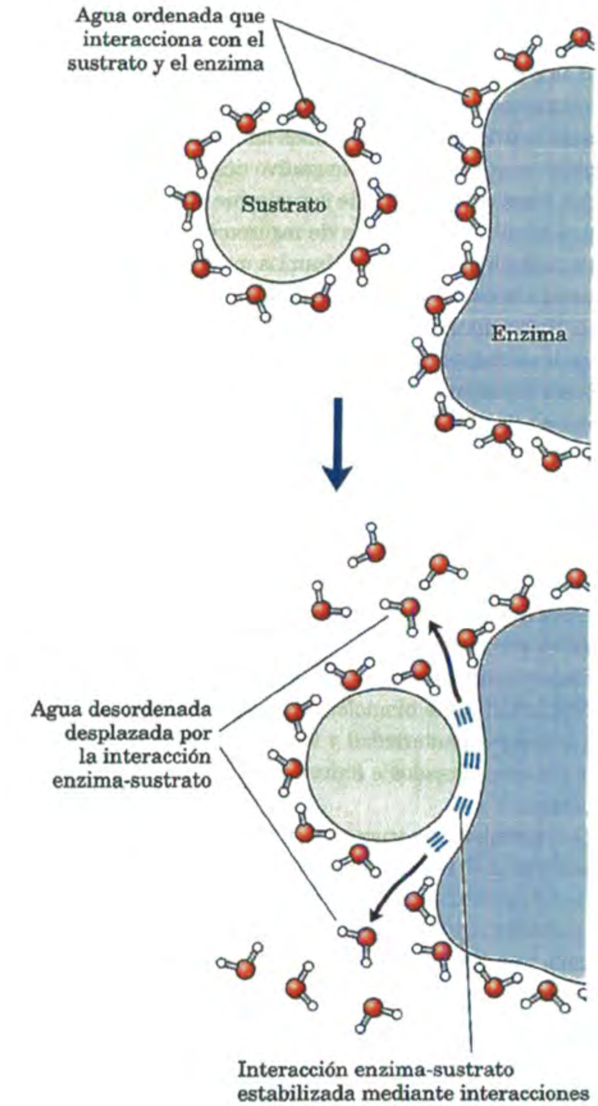


FIGURA 2–8 La liberación de agua ordenada favorece la formación de un complejo enzima-sustrato. Cuando están separados, tanto el enzima como el sustrato fuerzan a las moléculas de agua cercanas a formar una capa ordenada. La unión del sustrato al enzima libera parte del agua ordenada, y el aumento de entropía resultante proporciona un "empujón" termodinámico a la formación del complejo enzima-sustrato (véase la p. 192).

La formación de enlaces de hidrógeno entre el agua y los solutos polares también produce un cierto ordenamiento de las moléculas de agua, pero el efecto energético es menos significativo que con los solutos apolares. Parte de la fuerza impulsora de la unión de un sustrato polar (reactivo) a la superficie polar complementaria de un enzima es el aumento de entropía que tiene lugar por el desplazamiento por parte del enzima de moléculas de agua ordenadas del sustrato y por el desplazamiento recíproco de moléculas de agua ordenadas en la superficie del enzima por parte del sustrato **(Fig. 2–8)**.

Las interacciones de van der Waals son atracciones interatómicas débiles

Cuando dos átomos no cargados se encuentran muy cerca, las nubes electrónicas que los rodean se influyen mutuamente. Variaciones al azar en las posiciones de los electrones alrededor del núcleo pueden crear un dipolo eléctrico transitorio, que induce un dipolo eléctrico opuesto también transitorio en el átomo cercano. Los dos dipolos se atraen débilmente entre sí, con lo que los núcleos se acercan más. Estas atracciones débiles se denominan **interacciones de van der Waals** (conocidas también como **fuerzas de London**). A medida que los dos núcleos se acercan entre sí sus nubes electrónicas empiezan a repelerse. En el punto en que la atracción neta es máxima se dice que los núcleos se encuentran a la distancia de contacto de van der Waals. Cada átomo posee un **radio de van der Waals** característico, que constituye una medida de lo que este átomo permitirá acercarse a otro (Tabla 2–4). En los modelos moleculares espaciales que se muestran a lo largo de este libro los átomos se representan con tamaños proporcionales a sus radios de van der Waals.

TABLA 2–4 Radios de van der Waals y radios de enlace covalente (simple) de algunos elementos

Elemento	Radio de van der Waals (nm)	Radio covalente del enlace simple (nm)
H	0,11	0,030
O	0,15	0,066
N	0,15	0,070
C	0,17	0,077
S	0,18	0,104
P	0,19	0,110
I	0,21	0,133

Fuentes: Radios de van der Waals: Chauvin, R. (1992) Explicit periodic trend of van der Waals radii. *J.Phys. Chem.* 96, 9194-9197. Radios covalentes: Pauling, L. (1960) *Nature of the Chemical Bond*, 3ª ed., Cornell University Press, Ithaca, NY.

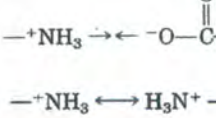
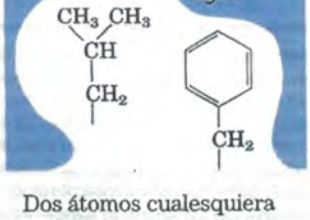
Nota: Los radios de van der Waals describen las dimensiones espaciales de los átomos. Cuando se unen covalentemente dos átomos, los radios atómicos en el punto de enlace son menores que los radios de van der Waals porque el par de electrones compartido acerca a los dos átomos. La distancia entre núcleos en una interacción de van der Waals o en un enlace covalente es aproximadamente igual a la suma de los radios de van der Waals o de los radios covalentes de los dos átomos, respectivamente. De este modo, la longitud de un enlace simple carbono-carbono es de aproximadamente 0,077 nm + 0,077 nm = 0,154 nm.

Las interacciones débiles son cruciales para la estructura y función de las macromoléculas

Las interacciones no covalentes que hemos descrito (enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas, hidrofóbicas y de van der Waals) (Tabla 2–5) son mucho más débiles que los enlaces covalentes. Se requiere un aporte de energía de unos 350 kJ para romper un mol (6×10^{23}) de enlaces C—C simples y de unos 410 kJ para romper un mol de enlaces C—H, pero solamente se requieren unos 4 kJ para destruir un mol de interacciones de van der Waals típicas. Las interacciones hidrofóbicas son también mucho más débiles que los enlaces covalentes, aunque un disolvente de polaridad elevada (una disolución salina concentrada, por ejemplo) las refuerza sustancialmente. Las interacciones iónicas y los enlaces de hidrógeno son de fuerza variable, que depende de la polaridad del disolvente y del grado de alineamiento de los átomos unidos por enlace de hidrógeno, pero son siempre significativamente más débiles que los enlaces covalentes. En un disolvente acuoso a 25 °C, la energía térmica disponible puede ser del mismo orden de magnitud que la fuerza de estas interacciones débiles y la interacción entre las moléculas de soluto y de disolvente (agua) es casi tan favorable como las interacciones soluto-soluto. En consecuencia, los enlaces de hidrógeno y las interacciones iónicas, hidrofóbicas y de van der Waals se forman y rompen continuamente.

Aunque cada uno de estos cuatro tipos de interacciones es débil en comparación a un enlace covalente, el efecto acumulativo de muchas interacciones de este tipo puede ser muy significativo. Por ejemplo, la unión no covalente de un enzima a su sustrato puede implicar varios enlaces de hidrógeno y una o más interacciones iónicas así como interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. La formación de cada uno de estos enlaces débiles contribuye a un descenso neto de la energía libre del sistema. Podemos calcular la estabilidad de una interacción no covalente, tal como la de una molécula pequeña unida por enlaces de hidrógeno a su pareja macromolecular, a partir de la energía de unión. La estabilidad, medida por la constante de equilibrio (véase más adelante) de la reacción de unión, varía de forma *exponencial* con la energía de unión. La disociación de dos biomoléculas (tales como un enzima y su sustrato unido) asociadas de forma no covalente mediante múltiples interacciones débiles requiere que se destruyan al mismo tiempo todas estas interacciones. Dado que las interacciones fluctúan al azar, tal destrucción simultánea es muy poco probable. La estabilidad molecular conferida por 5 o 20 interacciones débiles es, por tanto, mucho mayor de lo que podría esperarse intuitivamente de una simple adición de las pequeñas energías de unión.

TABLA 2–5 Cuatro tipos de interacciones no covalentes ("débiles") entre biomoléculas en disolución acuosa

Enlaces de hidrógeno	
Entre grupos neutros	
Entre enlaces peptídicos	
Interacciones iónicas	
Atracción	$—^+NH_3 \rightarrow\leftarrow\ ^-O—\overset{O}{\overset{\Vert}{C}}—$
Repulsión	$—^+NH_3 \longleftrightarrow H_3N^+—$
Interacciones hidrofóbicas	
Interacciones de van der Waals	Dos átomos cualesquiera muy próximos

Las macromoléculas tales como las proteínas, el DNA y el RNA contienen tantos sitios potenciales para la formación de enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas, de van der Waals o hidrofóbicas que el efecto acumulativo del gran número de pequeñas fuerzas de unión puede ser enorme. La estructura más estable (nativa) de la mayoría de macromoléculas es normalmente aquella en que se maximizan las uniones débiles. El plegamiento de una cadena polipeptídica o polinucleotídica en su forma tridimensional viene determinado por este principio. La unión de un antígeno a un anticuerpo específico depende de los efectos acumulativos de muchas interacciones débiles. Tal como se ha señalado anteriormente, la energía liberada cuando un enzima se une de manera no covalente a su sustrato es la fuente principal del poder catalítico del enzima. La unión de una hormona o un neurotransmisor a su receptor celular proteico es el resultado de múltiples interacciones débiles. Una consecuencia del gran tamaño de los enzimas y de los receptores (en relación a sus sustratos o ligandos) es que sus grandes superficies proporcionan muchas oportunidades para el establecimiento de interacciones débiles. A nivel molecular, la complementariedad entre biomoléculas que interaccionan entre sí refleja la complementariedad y las interacciones débiles entre grupos polares, cargados e hidrofóbicos en la superficie de las moléculas.

Al determinar la estructura de una proteína como la hemoglobina **(Fig. 2–9)** por cristalografía de rayos X (véase el Recuadro 4–5, p. 132), resulta frecuente encontrar moléculas de agua unidas tan fuertemente que forman parte de la estructura cristalina; lo mismo ocurre en cristales de RNA o DNA. Estas moléculas de agua unidas, detectables también en disolución mediante resonancia magnética nuclear, poseen propiedades que las distinguen del resto de agua del disolvente. Son, por ejemplo, osmóticamente inactivas (véase más adelante). El agua fuertemente unida es esencial para la función de muchas proteínas. Por ejemplo, en una de las reacciones clave del proceso de la fotosíntesis, la energía de la luz se utiliza para bombear protones a través de una membrana biológica al tiempo que se produce un flujo de electrones a través de una serie de proteínas transportadoras (véase la Fig. 19–60). Una de estas proteínas, el citocromo *f*, tiene unida una cadena de cinco moléculas de agua **(Fig. 2–10)** que puede proporcionar una vía

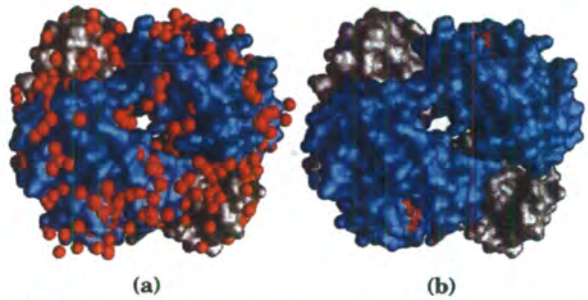


FIGURA 2–9 Unión del agua a la hemoglobina. La estructura cristalina de la hemoglobina (PDB ID 1A3N) se muestra en **(a)** con sus moléculas de agua unidas (esferas rojas) y en **(b)** sin las moléculas de agua. Las moléculas de agua se hallan tan firmemente unidas a la proteína que afectan al patrón de difracción de rayos X como si formaran parte del cristal. Las dos subunidades α de la hemoglobina se muestran en color gris y las dos subunidades β en azul. Cada subunidad tiene unido un grupo hemo (estructura de varillas roja), que sólo es visible en las subunidades β en esta figura. La estructura y función de la hemoglobina se discuten con detalle en el Capítulo 5.

para el movimiento de los protones a través de la membrana según un proceso conocido como "salto de protones" (que se describe más adelante). Casi con toda seguridad, otra bomba de protones que utiliza la energía de la luz, la bacteriorrodopsina, usa una cadena de moléculas de agua unidas y orientadas de una forma precisa para el movimiento transmembrana de los protones (véase la Fig. 19–67).

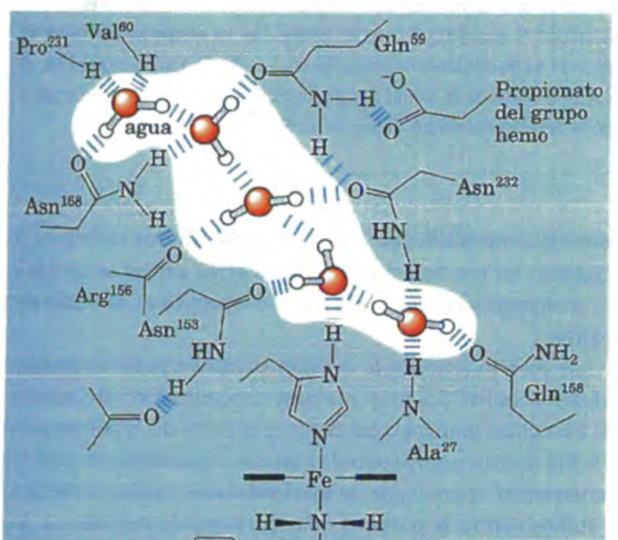


FIGURA 2–10 Cadena de agua en el citocromo *f*. Hay agua unida en el canal de protones de la proteína de membrana citocromo *f*, que forma parte de la maquinaria captadora de energía de la fotosíntesis en cloroplastos (véase la Fig. 19–64). Cinco moléculas de agua están unidas mediante enlaces de hidrógeno entre ellas y con grupos funcionales de la proteína: los átomos de cadena principal de residuos de valina, prolina, arginina y alanina y las cadenas laterales de tres residuos asparagina y dos residuos glutamina. La proteína tiene un grupo hemo unido (véase la Fig. 5–1) que, mediante su átomo de hierro, facilita el flujo de electrones durante la fotosíntesis. El flujo electrónico está acoplado al movimiento de protones a través de la membrana, lo que probablemente implica que tenga lugar un "salto de protones" (véase la Fig. 2–13) a lo largo de esta cadena de moléculas de agua unidas.

Los solutos afectan a las propiedades coligativas de las disoluciones acuosas

Los solutos de cualquier tipo alteran ciertas propiedades físicas del agua disolvente: su presión de vapor, punto de ebullición, punto de fusión (punto de congelación) y presión osmótica. Éstas se denominan **propiedades coligativas** (coligativas significa "ligadas entre sí") puesto que el efecto de los solutos sobre las cuatro propiedades tiene la misma base: la concentración de agua es menor en las disoluciones que en el agua pura. El efecto de la concentración de soluto sobre las propiedades coligativas del agua es independiente de las propiedades químicas del soluto; depende únicamente del *número* de partículas de soluto (moléculas, iones) en una determinada cantidad de agua. Un compuesto tal como el NaCl, que se disocia en disolución, tiene un efecto doble sobre la presión osmótica, por ejemplo, que un número idéntico de moles de un soluto que no se disocie tal como la glucosa.

Las moléculas de agua tienden a trasladarse desde una región de elevada concentración de agua a una de concentración inferior. Cuando dos disoluciones acuosas diferentes están separadas por una membrana semipermeable (que deja pasar moléculas de agua pero no del soluto), las moléculas de agua que difunden de la región de alta concentración de agua hacia la de concentración de agua menor producen presión osmótica **(Fig. 2–11)**. El valor aproximado de esta presión, Π, medida como la fuerza necesaria para oponerse al movimiento del agua (Fig. 2–11c), viene dado por la ecuación de van't Hoff:

$$\Pi = icRT$$

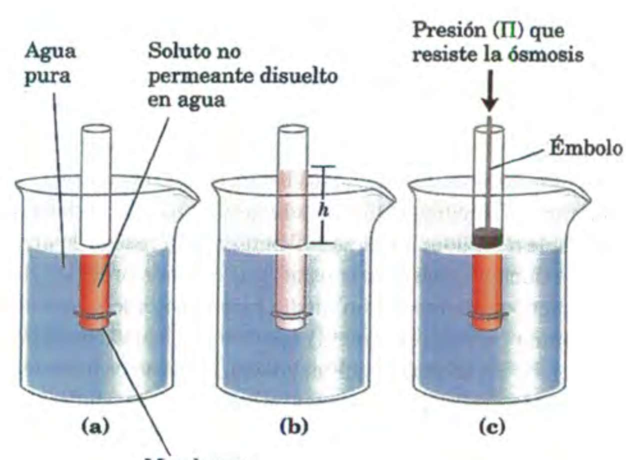


FIGURA 2–11 Ósmosis y medida de la presión osmótica. **(a)** Estado inicial. El tubo contiene una disolución acuosa, el vaso contiene agua pura y la membrana semipermeable permite el paso de agua pero no de soluto. El agua fluye desde el vaso hacia el tubo para igualar su concentración a un lado y a otro de la membrana. **(b)** Estado final. Se ha movido agua hacia la disolución del compuesto no permeante, diluyéndola y elevando la columna de agua dentro del tubo. En el equilibrio, la fuerza de la gravedad que actúa sobre la disolución que hay en el tubo equilibra exactamente la tendencia del agua a moverse hacia el interior del tubo, donde su concentración es menor. **(c)** La presión osmótica (Π) se mide como la fuerza que hay que aplicar para devolver la solución del tubo de nuevo al nivel de la del vaso. Esta fuerza es proporcional a la altura, *h*, de la columna en **(b)**.

en la que R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. El término ic es la **osmolaridad** de la disolución, el producto del factor de van't Hoff i, que es una medida del grado de disociación del soluto en dos o más especies iónicas y la concentración molar de soluto c. En disoluciones diluidas de NaCl, el soluto se disocia completamente en iones Na^+ y Cl^-, doblando el número de partículas de soluto, de modo que $i = 2$. En todos los solutos no ionizables, $i = 1$. Para disoluciones de varios (n) solutos, Π es la suma de las contribuciones de cada especie:

$$\Pi = RT\,(i_1c_1 + i_2c_2 + \cdots + i_nc_n)$$

La **ósmosis**, el movimiento de agua a través de una membrana semipermeable impulsado por diferencias en la presión osmótica, es un factor muy importante en la vida de la mayoría de las células. Las membranas plasmáticas son más permeables al agua que a la mayor parte del resto de moléculas pequeñas, iones y macromoléculas. Esta permeabilidad es debida en gran parte a canales proteicos (acuaporinas; véase la Fig. 11–46) presentes en las membranas que permiten el paso selectivo de agua. Se dice que las disoluciones de igual osmolaridad que el citosol celular son **isotónicas** con respecto a esa célula. Una célula rodeada por una disolución isotónica no gana ni pierde agua **(Fig. 2–12).** En una disolución **hipertónica,** con una osmolaridad mayor que el citosol, la célula se encoge al salir agua hacia fuera. En una disolución **hipotónica,** de osmolaridad menor que el citosol, las células se hinchan al penetrar el agua en ellas. En su medio habitual, las células contienen generalmente concentraciones más elevadas de biomoléculas e iones que sus alrededores, de forma que la presión osmótica tiende a impulsar agua hacia el interior de las células. Si no se equilibrara de alguna forma, este movimiento de agua hacia dentro distendería la membrana plasmática y llegaría a causar la explosión de la célula (lisis osmótica).

A lo largo de la evolución han surgido varios mecanismos para evitar esta catástrofe. En las bacterias y los vegetales, la membrana plasmática está rodeada de una pared celular no expandible de rigidez y fuerza suficientes para resistir la presión osmótica y evitar la lisis osmótica. Algunos protistas de agua dulce, que viven en un medio muy hipotónico, poseen un orgánulo (vacuola contráctil) que bombea agua al exterior de la célula. En animales multicelulares, el plasma sanguíneo y el fluido intersticial (el fluido extracelular de las células) se mantienen a una osmolaridad cercana a la del citosol. La elevada concentración de albúmina y otras proteínas en el plasma sanguíneo contribuye a su osmolaridad. Las células también bombean activamente Na^+ y otros iones hacia el fluido intersticial para permanecer en equilibrio osmótico con su entorno.

Puesto que el efecto de los solutos en la osmolaridad depende del *número* de partículas disueltas, no de su *masa*, las macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos) tienen un efecto mucho menor en la osmolaridad de una disolución que la que tendría una misma masa de sus componentes monoméricos. Por ejemplo, un *gramo* de un polisacárido compuesto por 1.000 unidades de glucosa tiene el mismo efecto en la osmolaridad que un *miligramo* de glucosa. El almacenamiento de combustible en forma de polisacáridos (almidón o glucógeno) en vez de como glucosa u otros azúcares simples evita un aumento enorme de la presión osmótica en la célula de depósito.

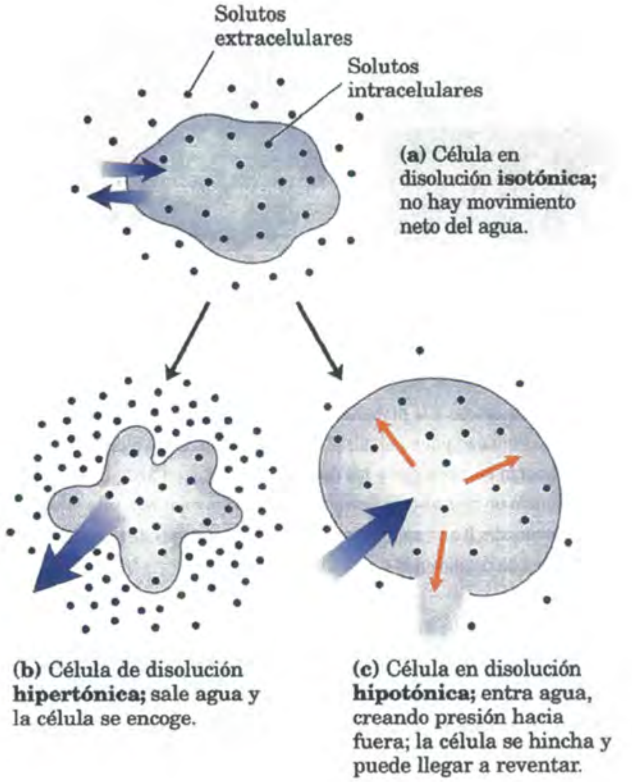


FIGURA 2–12 Efecto de la osmolaridad extracelular sobre el movimiento del agua a través de una membrana plasmática. Cuando una célula en equilibrio osmótico con el entorno que la rodea (esto es, en un medio isotónico) **(a)** se transfiere a una disolución hipertónica **(b)** o a una disolución hipotónica **(c)**, el agua fluye a través de la membrana plasmática en la dirección que tiende a igualar la osmolaridad dentro y fuera de la célula.

Las plantas utilizan la presión osmótica para conseguir rigidez mecánica. La muy elevada concentración de soluto en las vacuolas impulsa agua hacia el interior de la célula (véase la Fig. 2–12), pero la pared celular no expandible impide el hinchamiento; en su lugar, se incrementa la presión osmótica resultante contra la pared celular (presión de turgencia), lo que proporciona rigidez a la célula, al tejido y al organismo vegetal. Cuando la lechuga de su ensalada se marchita es debido a que la pérdida de agua ha reducido la presión de turgencia. La ósmosis también tiene importantes consecuencias en los protocolos de laboratorio. Las mitocondrias, los cloroplastos y los lisosomas, por ejemplo, están rodeados de membranas semipermeables. Para aislar estos orgánulos a partir de células rotas, los bioquímicos deben llevar a cabo los fraccionamientos en disoluciones isotónicas (véase la Fig. 1–8) para evitar la excesiva entrada de agua en los orgánulos, fenómeno que podría producir su hinchamiento y posterior rotura. Los tampones utilizados en los fraccionamientos celulares contienen normalmente concentraciones suficientes de sacarosa o de algún otro soluto inerte para proteger los orgánulos de la lisis osmótica.

EJEMPLO PRÁCTICO 2–1 Presión osmótica de un orgánulo I

Imagine que los solutos principales de lisosomas intactos son KCl (~0,1 M) y NaCl (~0,03 M). En un proceso de aislamiento de lisosomas, ¿cuál será la concentración de sacarosa necesaria en la disolución de extracción a temperatura ambiente (25 °C) para evitar el hinchamiento y la lisis?

Solución: Queremos hallar una concentración de sacarosa que nos dé una fuerza osmótica igual a la producida por el KCl y el NaCl de los lisosomas. La ecuación para calcular la presión osmótica (la ecuación de van't Hoff) es

$$\Pi = RT(i_1c_1 + i_2c_2 + i_3c_3 + \cdots + i_nc_n)$$

donde R es la constante de los gases, 8,315 J/mol · K, T es la temperatura absoluta (Kelvin), c_1, c_2 y c_3 son la concentración molar de cada soluto, e i_1, i_2 e i_3 son el número de partículas que cada soluto genera en disolución (i = 2 para KCl y NaCl).

La presión osmótica del contenido del lisosoma es

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{lisosoma}} &= RT(i_{\text{KCl}}c_{\text{KCl}} + i_{\text{NaCl}}c_{\text{NaCl}})\\ &= RT[(2)(0{,}03 \text{ mol/L}) + (2)(0{,}1 \text{ mol/L})] = RT(0{,}26 \text{ mol/L})\end{aligned}$$

Debido a que las concentraciones de soluto son exactas sólo hasta una cierta cifra significativa, $\Pi_{\text{lisosoma}} = RT(0{,}3 \text{ mol/L})$.

La presión osmótica de una disolución de sacarosa viene dada por

$$\Pi_{\text{sacarosa}} = RT(i_{\text{sacarosa}}\, c_{\text{sacarosa}})$$

En este caso, $i_{\text{sacarosa}} = 1$, porque la sacarosa no se ioniza. Por tanto,

$$\Pi_{\text{sacarosa}} = RT(c_{\text{sacarosa}})$$

La presión osmótica del contenido del lisosoma es igual a la de la disolución de sacarosa cuando

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{sacarosa}} &= \Pi_{\text{lisosoma}}\\ RT(c_{\text{sacarosa}}) &= RT(0{,}3 \text{ mol/L})\\ c_{\text{sacarosa}} &= 0{,}3 \text{ mol/L}\end{aligned}$$

De modo que la concentración de sacarosa necesaria (M_r 342) es (0,3 mol/L)(342 g/mol) = 102,6 g/L. O, si se tienen en cuenta tan sólo las cifras significativas, c_{sacarosa} = 0,1 kg/L.

EJEMPLO PRÁCTICO 2–2 Presión osmótica de un orgánulo II

Suponga que decidimos usar una disolución de polisacárido, como por ejemplo glucógeno (véase la página 246) para equilibrar la presión osmótica de los lisosomas (descrita en el Ejemplo Práctico 2–1). Considerando un polímero lineal de 100 unidades de glucosa, calcule la cantidad de este polímero necesaria para conseguir la misma presión osmótica que la disolución de sacarosa del Ejemplo Práctico 2–1. La M_r del polímero de glucosa es ~ 18.000 y, al igual que la sacarosa, no se ioniza en disolución.

Solución: Como se dedujo en el Ejemplo Práctico 2–1,

$$\Pi_{\text{sacarosa}} = RT(0{,}3 \text{ mol/L})$$

De manera similar,

$$\Pi_{\text{glucógeno}} = RT(i_{\text{glucógeno}}\, c_{\text{glucógeno}}) = RT(c_{\text{glucógeno}})$$

Para una disolución de glucógeno con la misma presión osmótica que la disolución de sacarosa,

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{glucógeno}} &= \Pi_{\text{sacarosa}}\\ RT(c_{\text{glucógeno}}) &= RT(0{,}3 \text{ mol/L})\\ c_{\text{glucógeno}} &= 0{,}3 \text{ mol/L} = (0{,}3\text{mol/L})(18.000 \text{ g/mol}) = 5{,}4 \text{ kg/L}\end{aligned}$$

O, considerando sólo las cifras significativas, $c_{\text{glucógeno}}$ = 5 kg/L, una concentración absurdamente elevada.

Tal como veremos más tarde (p. 246), las células de hígado y músculo no almacenan glúcidos en forma de azúcares de baja masa molecular como glucosa o sacarosa sino en forma del polímero de alta masa molecular glucógeno. Gracias a ello, la célula puede contener una gran masa de glucógeno sin afectar más que mínimamente la osmolaridad del citosol.

RESUMEN 2.1 Interacciones débiles en los sistemas acuosos

- Las muy diferentes electronegatividades del H y del O hacen del agua una molécula muy polar, capaz de formar enlaces de hidrógeno consigo misma y con sus solutos. Los enlaces de hidrógeno son de vida efímera, principalmente electrostáticos y más débiles que los enlaces covalentes. El agua es un buen disolvente de solutos polares (hidrofílicos), con los que forma enlaces de hidrógeno, y de solutos cargados, con los que interacciona electrostáticamente.
- Los compuestos apolares (hidrofóbicos) no se disuelven bien en el agua; no pueden formar enlaces de hidrógeno con el disolvente y su presencia induce un ordenamiento energéticamente desfavorable de moléculas de agua alrededor de sus superficies hidrofóbicas. Para minimizar la superficie expuesta al agua, los compuestos apolares tales como los lípidos forman agregados (micelas) en los que sus partes hidrofóbicas se hallan secuestradas en el interior mediante interacciones hidrofóbicas y sólo las partes más polares interaccionan con el agua.
- Numerosas interacciones débiles, no covalentes, influyen decisivamente sobre el plegamiento de macromoléculas tales como las proteínas o los ácidos nucleicos. Las conformaciones macromoleculares más estables son aquellas en las que se maximiza el número de enlaces de hidrógeno en el interior de la molécula y entre la molécula y el disolvente, y en las que las zonas hidrofóbicas se agrupan en el interior de la molécula, lejos del disolvente acuoso.
- La concentración de los solutos tiene una gran influencia sobre las propiedades físicas de las disoluciones acuosas. Cuando se separan dos compartimientos acuosos mediante una membrana semipermeable (como la membrana plasmática que separa la célula de su entorno), el agua fluye a través de esta membrana hasta igualar la osmolaridad de los dos compartimientos. Esa tendencia del agua a fluir a través de una membrana semipermeable recibe el nombre de presión osmótica.

2.2 Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles

Aunque gran parte de las propiedades del agua como disolvente se pueden explicar en función de la molécula neutra de H_2O, debe tenerse también en cuenta el pequeño grado de ionización del agua en iones hidrógeno (H^+) e iones hidroxilo (OH^-). Al igual que todas las reacciones reversibles, se puede describir la ionización del agua mediante una constante de equilibrio. Cuando se disuelven ácidos débiles en agua, su ionización aporta H^+; las bases débiles consumen H^+ al protonarse. Estos procesos también están gobernados por constantes de equilibrio. La concentración total de ión hidrógeno se puede medir experimentalmente y se expresa como el pH de la solución. Para predecir el estado de ionización de los solutos en agua, hemos de tener en cuenta las constantes de equilibrio pertinentes para cada reacción de ionización. Haremos por tanto ahora una breve discusión sobre la ionización del agua y de los ácidos y bases débiles disueltos en la misma.

El agua pura está ligeramente ionizada

Las moléculas de agua tienen una ligera tendencia a ionizarse reversiblemente para proporcionar un ión hidrógeno (protón) y un ión hidroxilo, dando el equilibrio

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad (2\text{–}1)$$

Aunque normalmente se muestra el producto de disociación del agua como H^+, los protones libres no existen en disolución; los iones hidrógeno formados en el agua son inmediatamente hidratados a **iones hidronio** (H_3O^+). La formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua hace que la hidratación de los protones disociados sea virtualmente instantánea:

$$\underset{\text{H}}{\text{H—O}} \cdots \underset{\text{H}}{\text{H—O}} \rightleftharpoons \underset{\text{H}}{\text{H—}\overset{+}{\text{O}}\text{—H}} + OH^-$$

La ionización del agua puede medirse a través de su conductividad eléctrica; el agua pura conduce la corriente eléctrica al migrar H_3O^+ hacia el cátodo y OH^- hacia el ánodo. El movimiento de los iones hidronio e hidroxilo en un campo eléctrico es extremadamente rápido en comparación con el de otros iones tales como el Na^+, K^+ y Cl^-. Esta elevada movilidad iónica es el resultado del "salto de protones" que se muestra en la **Figura 2–13.** Ningún protón individual se mueve muy lejos a través de la disolución, pero una serie de saltos de protones entre mo-

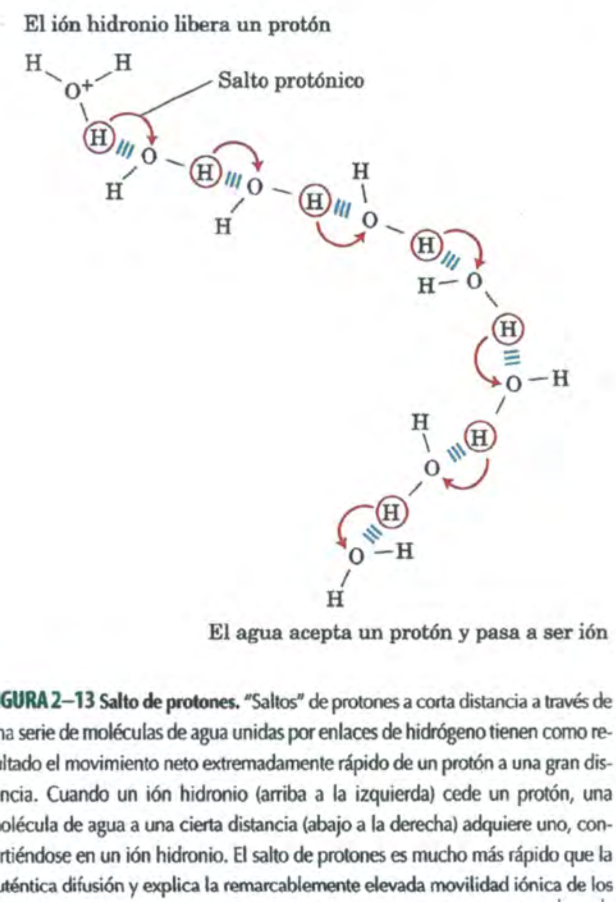


FIGURA 2–13 Salto de protones. "Saltos" de protones a corta distancia a través de una serie de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno tienen como resultado el movimiento neto extremadamente rápido de un protón a una gran distancia. Cuando un ión hidronio (arriba a la izquierda) cede un protón, una molécula de agua a una cierta distancia (abajo a la derecha) adquiere uno, convirtiéndose en un ión hidronio. El salto de protones es mucho más rápido que la auténtica difusión y explica la remarcablemente elevada movilidad iónica de los iones H^+ comparada con otros cationes monovalentes tales como el Na^+ o K^+.

léculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno causa el movimiento *neto* de un protón a una gran distancia en un tiempo notablemente corto. Como resultado de la elevada movilidad iónica del H^+ (y del OH^-, que también se mueve rápidamente mediante salto de protones, pero en la dirección opuesta), las reacciones ácido-base en disolución acuosa son excepcionalmente rápidas. Tal como se ha visto anteriormente, el salto de protones también desempeña probablemente un papel en las reacciones biológicas de transferencia de protones (Fig. 2–10; véase también la Fig. 19–67).

Puesto que la ionización reversible es crucial para el papel del agua en la función celular, hemos de tener una manera de expresar el grado de ionización del agua en términos cuantitativos. Un breve repaso de algunas propiedades de las reacciones químicas reversibles nos mostrará cómo podemos hacerlo.

La posición del equilibrio de cualquier reacción química viene dada por su **constante de equilibrio, K_{eq}** (a veces expresada simplemente como K). Para la reacción general

$$A + B \rightleftharpoons C + D \qquad (2\text{–}2)$$

se puede definir una constante de equilibrio en función de la concentración de los reactivos (A y B) y de los productos (C y D) presentes en el equilibrio:

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}[D]_{eq}}{[A]_{eq}[B]_{eq}}$$

En rigor, los términos de concentración deberían ser las *actividades*, o concentraciones efectivas en disoluciones no ideales, de cada especie. Sin embargo, excepto en cálculos muy precisos, se puede llegar a una aproximación de la constante de equilibrio midiendo las *concentraciones* en el equilibrio. Por razones que escapan a esta discusión, las constantes de equilibrio son adimensionales. Sin embargo, en las expresiones de equilibrio utilizadas en este libro hemos mantenido en general las unidades de concentración (M) para recordar que la molaridad es la unidad de concentración que se utiliza en el cálculo de K_{eq}.

La constante de equilibrio es fija y característica para cada reacción química a una temperatura dada. Define la composición de la mezcla final en el equilibrio, independientemente de las cantidades iniciales de reactivos y productos. De modo inverso, podemos calcular la constante de equilibrio de una reacción dada a una temperatura determinada si se conocen las concentraciones en el equilibrio de todos los reactivos y productos. Como hemos visto en el Capítulo 1 (p. 24), la variación estándar de energía libre ($\Delta G°$) está relacionada directamente con la K_{eq}.

La ionización del agua se expresa mediante una constante de equilibrio

El grado de ionización del agua en el equilibrio (Ec. 2–1) es pequeño; a unos 25 °C tan sólo dos de cada 10^9 moléculas en agua pura están ionizadas en un momento dado. La constante de equilibrio para la ionización reversible del agua es

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \qquad (2\text{–}3)$$

En agua pura a 25 °C, la concentración del agua es de 55,5 M, gramos de H_2O en 1 L divididos por el peso molecular en gramos: (1.000 g/L)/(18,015 g/mol), y es esencialmente constante en relación a las bajísimas concentraciones de H^+ y OH^-, es decir, 1×10^{-7} M. De acuerdo con ello podemos sustituir por 55,5 M el denominador de la expresión de la constante de equilibrio (Ec. 2–3) para dar

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[55{,}5\ \text{M}]}$$

Reordenando,

$$(55{,}5\ \text{M})(K_{eq}) = [H^+][OH^-] = K_w \qquad (2\text{–}4)$$

donde K_w designa el producto (55,5 M)(K_{eq}), denominado **producto iónico del agua** a 25 °C.

El valor de K_{eq}, determinado mediante medidas de conductividad eléctrica del agua pura, es $1{,}8 \times 10^{-16}$ M a 25 °C. La sustitución de este valor de K_{eq} en la Ecuación 2–4 da el valor del producto iónico del agua:

$$K_w = [H^+][OH^-] = (55{,}5\ \text{M})(1{,}8 \times 10^{-16}\ \text{M})$$
$$= 1{,}0 \times 10^{-14}\ \text{M}^2$$

Así el producto $[H^+][OH^-]$ en disoluciones acuosas a 25 °C es siempre igual a 1×10^{-14} M². Cuando las concentraciones de H^+ y OH^- son exactamente iguales, tal como sucede en el agua pura, se dice que la solución está a **pH neutro.** A este pH, se puede calcular la concentración de H^+ y OH^- a partir del producto iónico del agua de la manera siguiente:

$$K_w = [H^+][OH^-] = [H^+]^2 = [OH^-]^2$$

Despejando $[H^+]$ da

$$[H^+] = \sqrt{K_w} = \sqrt{1 \times 10^{-14}\ \text{M}^2}$$
$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}\ \text{M}$$

Dado que el producto iónico del agua es constante, siempre que $[H^+]$ sea superior a 1×10^{-7} M, $[OH^-]$ será inferior a 1×10^{-7} M, y viceversa. Cuando la $[H^+]$ es muy alta, tal como sucede en una solución de ácido clorhídrico, $[OH^-]$ será muy pequeña. A partir del producto iónico del agua podemos calcular $[H^+]$ si conocemos $[OH^-]$, y viceversa.

EJEMPLO PRÁCTICO 2–3 Cálculo de $[H^+]$

¿Cuál es la concentración de H^+ en una disolución de NaOH 0,1 M?

Solución: Empezamos con la ecuación del producto iónico del agua:

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Siendo $[OH^-]$ = 0,1 M, obtenemos $[H^+]$

$$[H^+] = \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{1 \times 10^{-14}\ \text{M}^2}{0{,}1\ \text{M}} = \frac{10^{-14}\ \text{M}^2}{10^{-1}\ \text{M}}$$
$$= 10^{-13}\ \text{M}$$

EJEMPLO PRÁCTICO 2–4 Cálculo de [OH⁻]

¿Cuál es la concentración de OH^- en una disolución en la que la concentración de H^+ es $1{,}3 \times 10^{-4}$ M?

Solución: Empezamos con la ecuación del producto iónico del agua:

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Siendo $[H^+] = 1{,}3 \times 10^{-4}$ M, obtenemos $[OH^-]$

$$[OH^-] = \frac{K_w}{[H^+]} = \frac{1 \times 10^{-14}\ \text{M}^2}{0{,}00013\ \text{M}} = \frac{10^{-14}\ \text{M}^2}{1{,}3 \times 10^{-4}\ \text{M}}$$

$$= 7{,}7 \times 10^{-11}\ \text{M}$$

En todos los cálculos asegúrese de que redondea su respuesta al número correcto de cifras significativas, como en este caso.

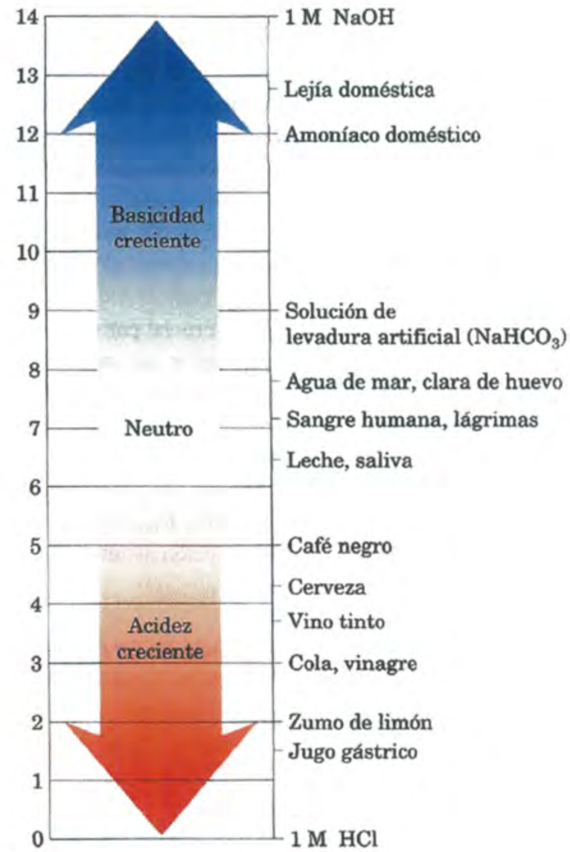


FIGURA 2–14 pH de algunos fluidos acuosos.

La escala de pH representa las concentraciones de H⁺ y OH⁻

El producto iónico del agua, K_w, constituye la base de la **escala de pH** (Tabla 2–6). Supone una manera conveniente de designar la concentración de H^+ (y por consiguiente de OH^-) en cualquier disolución acuosa entre 1,0 M de H^+ y 1,0 M de OH^-. El término **pH** se define mediante la expresión

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[H^+]} = -\log\ [H^+]$$

El símbolo p denota "logaritmo negativo de". Para una solución exactamente neutra a 25 °C, en la que la concentración de los iones hidrógeno es $1{,}0 \times 10^{-7}$ M, se puede calcular el pH de la manera siguiente:

$$\text{pH} = \log \frac{1}{1{,}0 \times 10^{-7}} = 7{,}0$$

obsérvese que la concentración de H^+ se debe expresar como molaridad (M).

El valor de 7 para el pH de una disolución exactamente neutra no es una cifra escogida de manera arbitraria; proviene del valor absoluto del producto iónico del agua a 25 °C, que por una feliz coincidencia es un número entero. Las disoluciones que tienen un pH superior a 7 son alcalinas o básicas y en ellas la concentración de OH^- es mayor que la de H^+. Inversamente, las disoluciones con un pH inferior a 7 son ácidas.

Recuerde que la escala de pH es logarítmica, no aritmética. Decir que el pH de dos soluciones difiere en 1 unidad de pH significa que una solución tiene una concentración de H^+ diez veces superior al de la otra, pero no nos dice cuál es el valor absoluto de la diferencia. La **Figura 2–14** indica el pH de algunos fluidos acuosos comunes. Una bebida de cola (pH 3,0) o un vino tinto (pH 3,7) tienen una concentración de H^+ aproximadamente 10.000 veces superior a la de la sangre (pH 7,4).

Se puede medir aproximadamente el pH de una solución acuosa utilizando diversos colorantes indicadores, entre ellos el tornasol, la fenolftaleína y el rojo fenol que experimentan cambios de color cuando se disocia un protón de la molécula de colorante. Las determinaciones precisas de pH en el laboratorio

TABLA 2–6 La escala de pH

$[H^+]$ (M)	pH	$[OH^-]$ (M)	pOH*
10^0 (1)	0	10^{-14}	14
10^{-1}	1	10^{-13}	13
10^{-2}	2	10^{-12}	12
10^{-3}	3	10^{-11}	11
10^{-4}	4	10^{-10}	10
10^{-5}	5	10^{-9}	9
10^{-6}	6	10^{-8}	8
10^{-7}	7	10^{-7}	7
10^{-8}	8	10^{-6}	6
10^{-9}	9	10^{-5}	5
10^{-10}	10	10^{-4}	4
10^{-11}	11	10^{-3}	3
10^{-12}	12	10^{-2}	2
10^{-13}	13	10^{-1}	1
10^{-14}	14	10^0 (1)	0

*A veces se utiliza la expresión pOH para describir la basicidad, o concentración de OH^-, de una solución; el pOH se define por la expresión $\text{pOH} = -\log[OH^-]$, que es análoga a la expresión para el pH. Obsérvese que en todos los casos, pH + pOH = 14.

químico o clínico se hacen con un electrodo de vidrio que es selectivamente sensible a la concentración de H^+ pero que es insensible al Na^+, K^+ y otros cationes. En un pHmetro se amplifica la señal de un electrodo de vidrio colocado en la disolución a ensayar y se compara con la señal generada por una disolución cuyo pH se conoce con exactitud.

La medición del pH es una de las operaciones más importantes y más frecuentemente utilizadas en bioquímica. El pH afecta la estructura y actividad de macromoléculas biológicas; por ejemplo la actividad catalítica de los enzimas depende fuertemente del pH (véase la Fig. 2–21). La medida del pH de la sangre y de la orina se utiliza normalmente para diagnosticar enfermedades. El pH del plasma sanguíneo de las personas con diabetes grave no controlada, por ejemplo, es con frecuencia inferior al valor normal de 7,4; este estado se conoce como **acidosis** (más adelante se describirá con mayor detalle). En otros estados patológicos el pH de la sangre es superior al normal, estado que se denomina **alcalosis.** La acidosis y la alcalosis extremas pueden poner en peligro la vida. ■

Los ácidos y bases débiles tienen constantes de disociación características

Los ácidos clorhídrico, sulfúrico y nítrico, denominados comúnmente ácidos fuertes, están completamente ionizados en soluciones acuosas diluidas; las bases fuertes NaOH y KOH también están ionizadas completamente. De mayor interés para los bioquímicos es el comportamiento de los ácidos y bases débiles, los que no están completamente ionizados al disolverse en el agua. Estos compuestos forman parte de todos los sistemas biológicos y juegan papeles importantes en el metabolismo y su regulación. Se comprenderá mejor el comportamiento de las disoluciones acuosas de los ácidos y bases débiles si definimos primero algunos términos.

Se pueden definir los ácidos como dadores de protones y las bases como aceptores de protones. Un dador de protón y su correspondiente aceptor forman un **par ácido-base conjugado (Fig. 2–15).** El ácido acético (CH_3COOH), un dador de protones y el anión acetato (CH_3COO^-), el correspondiente aceptor de protones, constituyen un par ácido–base conjugado, relacionado por la reacción reversible

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Cada ácido tiene una tendencia característica a perder su protón en disolución acuosa. Cuanto más fuerte sea el ácido mayor será la tendencia a perder su protón. La tendencia de cualquier ácido (HA) a perder un protón y formar su base conjugada (A^-) se define mediante la constante de equilibrio (K_{eq}) para la reacción reversible

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

para la que

$$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a$$

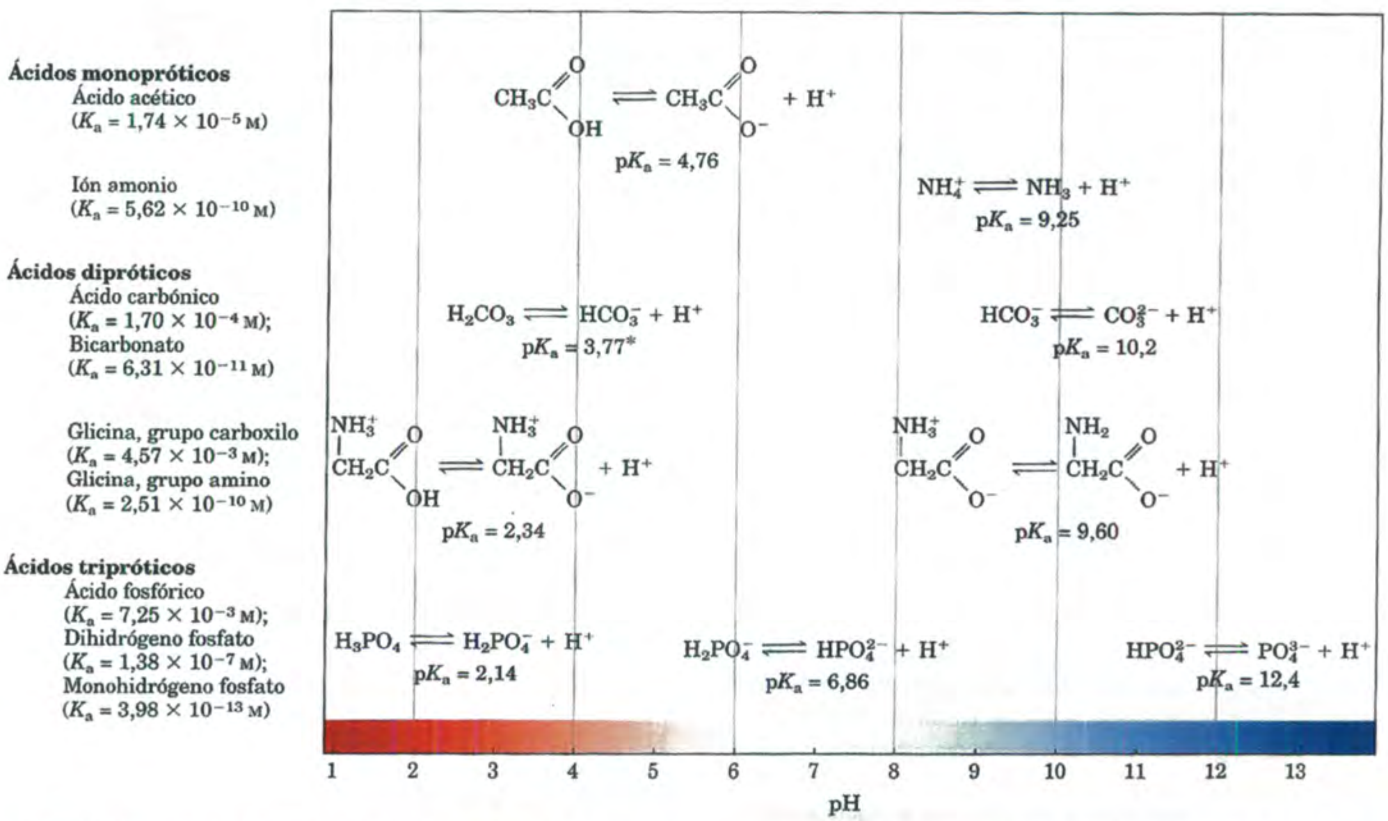


FIGURA 2–15 Un par ácido-base conjugado consiste en un dador de protones y un aceptor de protones. Algunos compuestos, tales como el ácido acético y el amoníaco, son monopróticos; pueden ceder solamente un protón. Otros son dipróticos (ácido carbónico y glicina) o tripróticos (ácido fosfórico). Se muestran las reacciones de disociación para cada par en donde tienen lugar a lo largo de un gradiente de pH. Para cada reacción se muestra la constante de equilibrio o disociación (K_a) y su logaritmo negativo, el pK_a. *Véase la explicación de aparentes discrepancias sobre los valores de pK_a del ácido carbónico (H_2CO_3) en la p. 63.

Las constantes de equilibrio de las reacciones de ionización se suelen denominar **constantes de ionización** o **constantes ácidas de disociación,** a menudo designadas como K_a. En la Figura 2–15 se dan las constantes de disociación de algunos ácidos. Los ácidos más fuertes, tales como el fosfórico y carbónico, tienen constantes de disociación más altas; los ácidos más débiles, tales como el monohidrógeno fosfato (HPO_4^{2-}), tienen constantes de disociación más bajas.

En la Figura 2–15 también se incluyen los valores de **pK_a**, una expresión análoga a la del pH y que se define mediante la ecuación

$$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a$$

Cuanto más fuerte sea la tendencia a disociar un protón, más fuerte es el ácido y menor es su pK_a. Como veremos a continuación, se puede determinar fácilmente el pK_a de cualquier ácido débil.

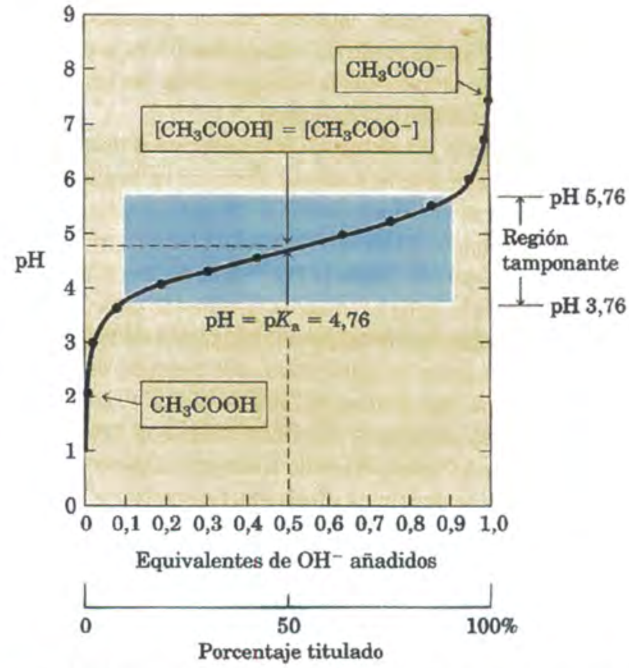


FIGURA 2–16 Curva de titulación del ácido acético. El pH de la mezcla se mide después de cada adición consecutiva de NaOH a la disolución de ácido acético. Este valor se representa frente a la cantidad de NaOH añadida, expresada como fracción de la cantidad total de NaOH requerida para convertir todo el ácido acético (CH_3COOH) en su forma desprotonada, el acetato (CH_3COO^-). Los puntos obtenidos de esta manera dan la curva de titulación. En los recuadros se muestran las formas iónicas predominantes en los puntos indicados. En el punto medio de la titulación las concentraciones del dador de protones y del aceptor de protones son iguales y el pH es numéricamente igual al pK_a del ácido acético. La zona sombreada es la región útil de capacidad tamponante, generalmente entre el 10% y el 90% de la titulación del ácido débil.

Las curvas de titulación revelan el pK_a de los ácidos débiles

La titulación se utiliza para determinar la cantidad de un ácido en una disolución dada. Un volumen determinado de ácido se titula con una disolución de concentración conocida de una base fuerte, normalmente hidróxido sódico (NaOH). Se añade NaOH en pequeñas cantidades hasta que se ha consumido (neutralizado) el ácido según se determina mediante un colorante indicador o con un aparato medidor de pH. Se puede calcular la concentración de ácido en la disolución original a partir del volumen y la concentración de NaOH añadido.

De la gráfica que representa el pH frente a la cantidad de NaOH añadido **(curva de titulación)** se deduce el pK_a del ácido débil. Consideremos la titulación de una disolución 0,1 M de ácido acético con NaOH 0,1 M a 25 °C **(Fig. 2–16).** En el proceso están implicados dos equilibrios reversibles (para simplificar, el ácido acético se denomina aquí HAc):

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad (2\text{–}5)$$

$$HAc \rightleftharpoons H^+ + Ac^- \qquad (2\text{–}6)$$

Los equilibrios deben cumplir simultáneamente sus constantes de equilibrio características que son, respectivamente,

$$K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}\ M^2 \qquad (2\text{–}7)$$

$$K_a = \frac{[H^+][Ac^-]}{[HAc]} = 1{,}74 \times 10^5\ M \qquad (2\text{–}8)$$

Al principio de la titulación, antes de añadir NaOH, el ácido acético ya está ligeramente ionizado, en un grado que se puede calcular a partir de su constante de disociación (Ec. 2–8).

A medida que se va incorporando gradualmente NaOH, el OH^- adicionado se combina con el H^+ libre en la disolución formando H_2O para satisfacer la relación de equilibrio de la Ecuación 2–7. A medida que se elimina H^+ libre, el HAc se disocia más para satisfacer su propia constante de equilibrio (Ec. 2–8). El resultado neto a medida que progresa la titulación es que se ioniza más y más HAc, formando Ac^-, según se va añadiendo NaOH. En el punto medio de la titulación, en la que se han añadido exactamente 0,5 equivalentes de NaOH, se ha disociado la mitad del ácido acético original, de modo que la concentración del dador de protones, [HAc], es igual a la del aceptor de protones [Ac^-]. En este punto medio tiene validez una relación muy importante: el pH de la solución equimolar de ácido acético y acetato es exactamente igual al pK_a del ácido acético (pK_a = 4,76; véanse las Figs. 2–15 y 2–16). Pronto quedará clara la base de esta relación, que es válida para todos los ácidos débiles.

A medida que continúa la titulación mediante la adición de mayores cantidades de NaOH, el ácido acético todavía sin disociar se convierte gradualmente en acetato. El punto final de la titulación tiene lugar a aproximadamente pH 7,0: todo el ácido acético ha perdido sus protones, dándolos al OH^-, para formar H_2O y acetato. A lo largo de la titulación coexisten los dos equilibrios (Ecs. 2–5 y 2–6), cumpliendo cada uno de ellos con su constante de equilibrio.

En la **Fig. 2–17** se comparan las curvas de titulación de tres ácidos débiles con constantes de disociación muy diferentes: el ácido acético (pK_a = 4,76); el dihidrógeno fosfato, $H_2PO_4^-$ (pK_a = 6,86) y el ión amonio, NH_4^+ (pK_a = 9,25). Aunque las curvas de titulación de estos ácidos tienen la misma forma, están desplazadas a lo largo del eje de pH debido a que los tres tienen diferente fuerza. El ácido acético, que tiene la mayor K_a

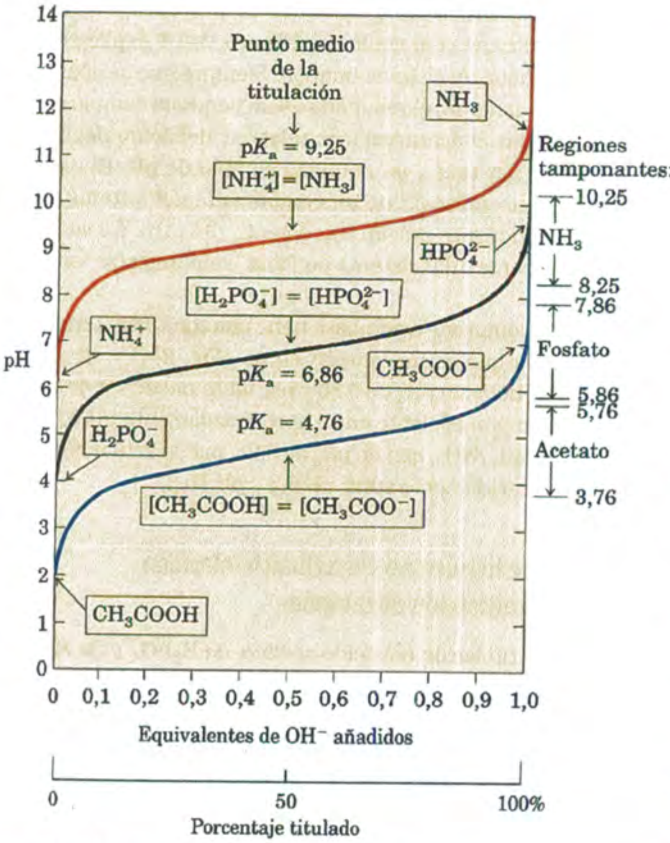


FIGURA 2–17 Comparación de las curvas de titulación de tres ácidos débiles. Se muestran las curvas de titulación de CH_3COOH, $H_2PO_4^-$ y NH_4^+. En los recuadros se muestran las formas iónicas predominantes en los puntos señalados de la titulación. Las regiones con capacidad tamponante están indicadas a la derecha. Los pares ácido-base conjugados son tampones efectivos entre aproximadamente el 10 y el 90% de la neutralización de la especie dadora de protones.

(el menor pK_a) de los tres es el más fuerte de los tres ácidos débiles (pierde su protón con más facilidad); a pH 4,76 se encuentra ya semidisociado. El dihidrógeno fosfato pierde un protón con menor facilidad, y está semidisociado a pH 6,86. El ión amonio es el ácido más débil de los tres y no está semidisociado hasta pH 9,25.

La curva de titulación de un ácido débil muestra gráficamente que un ácido débil y su anión, un par ácido-base conjugado, pueden actuar como sustancias tampón, que describimos en la sección siguiente.

RESUMEN 2.2 Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles

- El agua pura está ligeramente ionizada y contiene la misma cantidad de iones hidrógeno (iones hidronio, H_3O^+) e iones hidroxilo. El grado de ionización se describe mediante

  una constante de equilibrio, $K_{eq} = \dfrac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$,

  de la que se deduce el producto iónico del agua, K_w. A 25 °C, $K_w = [H^+][OH^-] = (55{,}5\ \text{M})(K_{eq}) = 10^{-14}\ \text{M}^2$.

- El pH de una disolución acuosa refleja, en escala logarítmica, la concentración de iones hidrógeno:

  $$pH = \log \frac{1}{[H^+]} = -\log [H^+].$$

- Cuanto mayor es la acidez de una disolución, menor será su pH. Los ácidos débiles se ionizan parcialmente y liberan un ión hidrógeno, lo que hace disminuir el pH de la disolución acuosa. Las bases débiles aceptan un ión hidrógeno y aumentan el pH. El grado en que se producen estos procesos es característico de cada ácido o base débiles en particular y se expresa como la constante de disociación:

  $$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a.$$

- El pK_a expresa la fuerza relativa de un ácido o base débiles en escala logarítmica:

  $$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a.$$

- Cuanto más fuerte sea un ácido, menor será su pK_a; cuanto más fuerte sea la base, mayor su pK_a. El pK_a se puede determinar experimentalmente; es el pH del punto medio de la curva de titulación del ácido o de la base.

2.3 Tamponamiento contra cambios de pH en los sistemas biológicos

Casi todos los procesos biológicos son dependientes del pH; un pequeño cambio en el pH produce un gran cambio en la velocidad del proceso. Esto no sólo es cierto para las muchas reacciones en las que el ión H^+ es un participante directo, sino también para aquellas en las que aparentemente no juegan ningún papel. Los enzimas que catalizan las reacciones celulares, y muchas de las moléculas sobre las que actúan, contienen grupos ionizables con valores de pK_a característicos. Los grupos amino y carboxilo protonados de los aminoácidos y el grupo fosfato de los nucleótidos, por ejemplo, funcionan como ácidos débiles; su estado iónico depende del pH del medio que los rodea. (Cuando un grupo ionizable se halla secuestrado dentro de una proteína, lejos del disolvente acuoso, su pK_a, o pK_a aparente, puede ser sensiblemente diferente de su pK_a en agua.) Tal como hemos señalado anteriormente, las interacciones iónicas se cuentan entre las fuerzas que estabilizan una molécula proteica y permiten que un enzima reconozca y se una a su sustrato.

Las células y los organismos mantienen un pH citosólico específico y constante, normalmente cerca de pH 7, que mantiene las biomoléculas en su estado iónico óptimo. En los organismos multicelulares, el pH de los fluidos extracelulares también se mantiene estrechamente regulado. El pH se mantiene constante principalmente gracias a los tampones biológicos, que son mezclas de ácidos débiles y de sus bases conjugadas.

Los tampones son mezclas de ácidos débiles y sus bases conjugadas

Los **tampones** son sistemas acuosos que tienden a resistir cambios en su pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácido

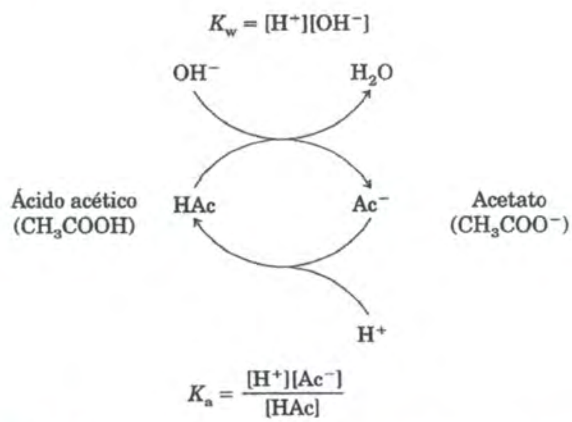


FIGURA 2–18 El par ácido acético-acetato como sistema tampón. El sistema es capaz de absorber H^+ u OH^- a través de la reversibilidad de la disociación del ácido acético. El dador de protones, el ácido acético (HAc), contiene una reserva de H^+ ligado, que puede liberarse para neutralizar una adición de OH^- al sistema formando H_2O. Esto sucede porque el producto $[H^+][OH^-]$ excede transitoriamente K_w (1×10^{-14} M^2). El equilibrio se ajusta rápidamente de modo que este producto sea igual a 1×10^{-14} M^2 (a 25 °C), reduciendo así transitoriamente la concentración de H^+. Pero ahora el cociente $[H^+][Ac]/[HAc]$ es menor que K_a, por lo que se disocia más HAc para restaurar el equilibrio. De modo semejante, la base conjugada, Ac^-, puede reaccionar con iones H^+ adicionados al sistema; de nuevo las dos reacciones de ionización vuelven simultáneamente al equilibrio. Así un par ácido-base conjugado, tal como el ácido acético y el ión acetato, tiende a resistir un cambio en el pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácido o base. La acción tamponante es simplemente la consecuencia de dos reacciones reversibles que tienen lugar simultáneamente y que alcanzan sus puntos de equilibrio según sus constantes de equilibrio, K_w y K_a.

(H^+) o base (OH^-). Un sistema tampón consiste en un ácido débil (dador de protones) y su base conjugada (aceptor de protones). Por ejemplo, una mezcla de igual concentración de ácido acético y de ión acetato, tal como la que se encuentra en el punto medio de la curva de titulación de la Figura 2–16, es un sistema tampón. Observe que la curva de titulación del ácido acético tiene una zona relativamente plana que se extiende alrededor de 1 unidad de pH a cada lado del pH de su punto medio, 4,76. Dentro de esta zona una cierta cantidad de H^+ u OH^- añadida al sistema tiene un efecto mucho menor sobre el pH que la misma cantidad añadida fuera de ella. Esta zona relativamente plana es la **región de tamponamiento** del par ácido acético-acetato. En el punto medio de la región de tamponamiento, donde la concentración del dador de protones (ácido acético) es exactamente igual a la del aceptor de protones (acetato), el poder tamponante del sistema es máximo; esto es, el cambio de pH es mínimo cuando se adiciona OH^- o H^+. El pH en este punto de la curva de titulación del ácido acético es igual a su pK_a. El pH del sistema tampón del acetato cambia ligeramente cuando se adiciona una pequeña cantidad de OH^- o de H^+, pero este cambio es muy pequeño si lo comparamos con el cambio de pH que se produciría si se añadiese la misma cantidad de OH^- o H^+ al agua pura o a una disolución de la sal de un ácido fuerte y una base fuerte, como puede ser el NaCl, que no tiene capacidad tamponante.

El tamponamiento es el resultado de dos equilibrios de reacciones reversibles que tienen lugar en una disolución con concentraciones casi iguales de dador de protones y de su aceptor de protones conjugado. La **Figura 2–18** explica de qué modo funciona un sistema tampón. Siempre que se añade H^+ u OH^- a un tampón, el resultado es un pequeño cambio en el cociente de las concentraciones relativas del ácido débil y de su anión y, por tanto, un pequeño cambio de pH. El descenso en la concentración de un componente del sistema se equilibra exactamente por un incremento del otro. La suma de los componentes del sistema no varía, sino que sólo varía su proporción.

Cada par conjugado ácido-base tiene una zona característica de pH en la que es un tampón eficaz (Fig. 2–17). El par $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ tiene un pK_a de 6,86 y por tanto puede servir como sistema tampón eficiente entre aproximadamente pH 5,9 y pH 7,9; el par NH_4^+/NH_3, con un pK_a de 9,25, puede actuar como tampón aproximadamente entre pH 8,3 y pH 10,3.

La ecuación de Henderson-Hasselbalch relaciona pH, pK_a y concentración de tampón

Las curvas de titulación del ácido acético, de $H_2PO_4^-$ y de NH_4^+ (Fig. 2–17) tienen formas casi idénticas, lo que sugiere que reflejan una ley o relación fundamental. Este es, efectivamente, el caso. La forma de la curva de titulación de cualquier ácido débil está expresada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch, que es importante para comprender la acción de los tampones y el equilibrio ácido–base en la sangre y tejidos de los vertebrados. Esta ecuación es simplemente una forma útil de enunciar de otro modo la expresión de la constante de ionización de un ácido. En el caso de la ionización de un ácido débil HA, la ecuación de Henderson-Hasselbalch puede deducirse de la siguiente forma:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Despejando primero $[H^+]$:

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Tomando el logaritmo negativo en ambos lados de la igualdad:

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Sustituyendo $-\log[H^+]$ por pH y $-\log K_a$ por pK_a:

$$\text{pH} = \text{p}K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Invirtiendo ahora $-\log[HA]/[A^-]$, lo que implica un cambio de signo, se obtiene la **ecuación de Henderson-Hasselbalch:**

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (2\text{–}9)$$

Esta ecuación se ajusta a la curva de titulación de todos los ácidos débiles y nos permite deducir una serie de relaciones cuantitativas importantes. Por ejemplo, muestra por qué el pK_a de un ácido débil es igual al pH de la solución en el punto medio de su titulación. En este punto, $[HA] = [A^-]$ y de ahí

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log 1 = \text{p}K_a + 0 = \text{p}K_a$$

La ecuación de Henderson-Hasselbalch también permite (1) calcular el pK_a a partir del pH y la relación molar entre dador y aceptor de protones; (2) calcular el pH a partir del pK_a y la relación molar entre dador y aceptor de protones, y (3) calcular la relación molar entre dador y aceptor de protones, conocidos el pH y el pK_a.

Ácidos o bases débiles tamponan células y tejidos contra cambios de pH

Los fluidos intra y extracelulares de los organismos multicelulares poseen un pH característico y prácticamente constante. Los sistemas tampón proporcionan la primera línea de defensa del organismo contra los cambios del pH interno. El citoplasma de la mayoría de células contiene elevadas concentraciones de proteínas, las cuales contienen muchos aminoácidos con grupos funcionales que son ácidos débiles o bases débiles. Por ejemplo, la cadena lateral de la histidina **(Fig. 2–19)** tiene un pK_a de 6,0; las proteínas que contienen residuos de histidina pueden, por lo tanto, tamponar de manera eficiente a un pH cercano a la neutralidad.

EJEMPLO PRÁCTICO 2–5 Ionización de la histidina

Calcule la fracción de histidina que tiene su cadena lateral de imidazol protonada a pH 7,3. Los valores de pK_a de la histidina son $pK_1 = 1{,}82$, pK_2 (imidazol) $= 6{,}00$ y $pK_3 = 9{,}17$ (véase la Fig. 3–12b).

Solución: Los tres grupos ionizables de la histidina tienen valores de pK_a suficientemente diferentes para que el primer grupo ácido (—COOH) esté completamente disociado antes de que el segundo (imidazol protonado) empiece a perder su protón, y el segundo se ioniza completamente antes de que el tercero ($—NH_3^+$) empiece a perder el suyo. (Con la ecuación de Henderson-Hasselbalch podemos demostrar fácilmente que un ácido débil va desde una ionización del 1% a 2 unidades de pH por debajo de su pK_a a una ionización del 99% a dos unidades de pH por encima de su pK_a; véase también la Fig. 3–12b.) A pH 7,3, el grupo carboxilo de la histidina está completamente desprotonado ($—COO^-$) y el grupo α-amino completamente protonado ($—NH_3^+$). Podemos, por tanto, suponer que a pH 7,3 el único grupo que se encuentra parcialmente disociado es el grupo imidazol, que puede estar protonado (abreviado $HisH^+$) o no (His).

Utilizamos la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Sustituyendo $pK_2 = 6{,}0$ y $pH = 7{,}3$:

$$7{,}3 = 6{,}0 + \log \frac{[His]}{[HisH^+]}$$

$$1{,}3 = \log \frac{[His]}{[HisH^+]}$$

$$\text{antilog } 1{,}3 = \frac{[His]}{[HisH^+]} = 2{,}0 \times 10^1$$

La fracción de histidina total que se encuentra en la forma protonada $HisH^+$ a pH 7,3 es 1/21 (1 parte de $HisH^+$ en un total de 21 partes de histidina en cualquiera de sus dos formas), o un 4,8%.

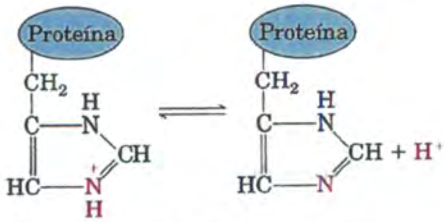


FIGURA 2–19 Ionización de la histidina. El aminoácido histidina, componente de las proteínas, es un ácido débil. El pK_a del nitrógeno protonado de la cadena lateral es 6,0.

Nucleótidos tales como el ATP, así como muchos metabolitos de baja masa molecular, contienen grupos ionizables que pueden contribuir al poder tamponante del citoplasma. Algunos orgánulos altamente especializados y compartimientos extracelulares contienen elevadas concentraciones de compuestos que contribuyen a la capacidad tamponante: los ácidos orgánicos tamponan las vacuolas de las células vegetales; el amoníaco tampona la orina.

Dos tampones biológicos especialmente importantes son los sistemas del fosfato y del bicarbonato. El sistema tampón del fosfato, que actúa en el citoplasma de todas las células, consiste en $H_2PO_4^-$ como dador de protones y HPO_4^{2-} como aceptor de protones:

$$H_2PO_4^- \rightleftharpoons H^+ + HPO_4^{2-}$$

El sistema tampón del fosfato presenta su efectividad máxima a un pH próximo a su pK_a de 6,86 (Figs. 2–15, 2–17), y tiende pues a resistir los cambios de pH en el intervalo entre 5,9 y 7,9. Es, por tanto, un tampón efectivo en los fluidos biológicos; en los mamíferos, por ejemplo, los fluidos extracelulares y la mayoría de compartimientos citoplasmáticos tienen un pH en el intervalo de 6,9 a 7,4 (véase el Ejemplo Práctico 2–6).

El plasma sanguíneo está tamponado en parte por el sistema del bicarbonato que consiste en ácido carbónico (H_2CO_3) como dador de protones y el bicarbonato (HCO_3^-) como aceptor de protones (K_1 representa la primera de varias constantes de equilibrio en el sistema tampón del bicarbonato):

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Este sistema tampón es más complejo que otros pares ácido-base conjugados, ya que uno de sus componentes, el ácido carbónico (H_2CO_3) se forma a partir de dióxido de carbono disuelto (d) y agua, según la reacción reversible:

$$CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

$$K_2 = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(d)][H_2O]}$$

EJEMPLO PRÁCTICO 2–6 Tampones fosfato

(a) ¿Cuál es el pH de una mezcla de 0,042 M de NaH_2PO_4 y 0,058 M de Na_2HPO_4?

Solución: Utilizamos la ecuación de Henderson-Hasselbalch, que expresaremos como:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido}]}$$

En este caso, el ácido (la especie que libera un protón) es $H_2PO_4^-$, y la base conjugada (la especie que ha perdido un protón) es HPO_4^{2-}. Sustituyendo con las concentraciones dadas de ácido y base conjugada y con el valor del pK_a (6,86),

$$pH = 6{,}86 + \log\left(\frac{0{,}058}{0{,}042}\right) = 6{,}86 + \log 1{,}38 = 6{,}86 + 0{,}14 = 7{,}0$$

Podemos comprobar de modo cualitativo si esta respuesta es correcta. Si hay una mayor cantidad de base conjugada presente que de ácido, la titulación del ácido está por encima del 50% y el pH está por encima del pK_a (6,86), punto en el cual el ácido está titulado al 50%.

(b) Si se añade 1,0 mL de NaOH 10,0 N a un litro del tampón preparado en **(a)**, ¿cuánto variará el pH?

Solución: Un litro de tampón contiene 0,042 moles de NaH_2PO_4. La adición de 1,0 mL de NaOH 10,0 N (0,010 moles) titularía una cantidad equivalente (0,010 moles) de NaH_2PO_4 a Na_2HPO_4, resultando en 0,032 moles de NaH_2PO_4 y 0,068 moles de Na_2HPO_4. El nuevo pH es:

$$pH = pK_a + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

$$= 6{,}86 + \log \frac{0{,}068}{0{,}032} = 6{,}86 + 0{,}33 = 7{,}2$$

(c) Si se añade 1,0 mL de NaOH 10,0 N a un litro de agua pura a pH 7,0 ¿cuál será el pH final? Compárelo con la respuesta obtenida en **(b)**.

Solución: El NaOH se disocia completamente en Na^+ y OH^-, dando $[OH^-] = 0{,}010$ mol/L = $1{,}0 \times 10^{-2}$ M. El pOH es el logaritmo negativo de $[OH^-]$, de modo que pOH = 2,0. Dado que en todas las disoluciones, pH + pOH = 14, el pH de la disolución es 12.

Por tanto, una cantidad de NaOH que incrementa el pH del agua desde 7 a 12, incrementa el pH de una disolución tamponada, sólo de 7,0 a 7,2. ¡Así es la capacidad del tamponamiento!

El dióxido de carbono es un gas en condiciones normales, y la concentración de CO_2 disuelto resulta de su equilibrio con el CO_2 de la fase gaseosa (g):

$$CO_2(g) \rightleftharpoons CO_2(d)$$

$$K_3 = \frac{[CO_2(d)]}{[CO_2(g)]}$$

El pH de un sistema tampón de bicarbonato depende de la concentración de H_2CO_3 y de HCO_3^-, dador y aceptor de protones respectivamente. A su vez, la concentración de H_2CO_3 depende de la concentración de CO_2 disuelto, que a su vez depende de la concentración del CO_2 en la fase gaseosa, denominada **presión parcial** de CO_2 o pCO_2. Así, el pH de un tampón bicarbonato expuesto a una fase gaseosa viene determinado en último término por la concentración de HCO_3^- en la fase acuosa y la pCO_2 en la fase gaseosa.

El sistema tampón del bicarbonato es un tampón fisiológico eficiente cerca de pH 7,4 ya que el H_2CO_3 del plasma sanguíneo está en equilibrio con una gran capacidad de reserva de $CO_2(g)$ en el espacio aéreo de los pulmones. Como se ha dicho antes, este sistema tampón implica tres equilibrios reversibles, en este caso entre CO_2 gaseoso en los pulmones y bicarbonato (HCO_3^-) en el plasma sanguíneo **(Fig. 2–20)**.

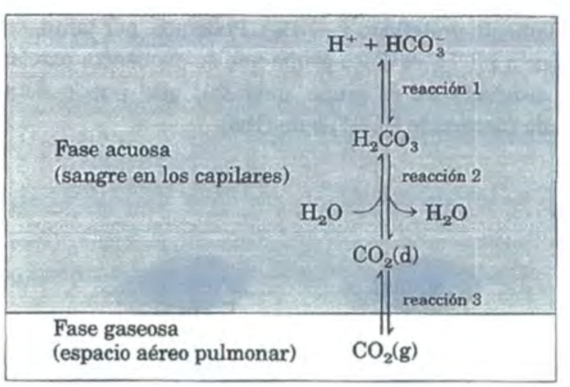


FIGURA 2–20 El sistema tampón del bicarbonato. El CO_2 del espacio aéreo de los pulmones está en equilibrio con el tampón bicarbonato en el plasma sanguíneo que pasa a través de los capilares pulmonares. Dado que la concentración de CO_2 disuelto se ajusta rápidamente mediante cambios en la velocidad de respiración, el sistema tampón del bicarbonato de la sangre está en un cuasi-equilibrio con una gran reserva potencial de CO_2.

Cuando se añade H^+ (por ejemplo, a partir de ácido láctico producido en el tejido muscular durante el ejercicio vigoroso) a la sangre, a medida que ésta pasa por los tejidos, la reacción 1 de la Figura 2–20 transcurre hacia un nuevo equilibrio en el que aumenta $[H_2CO_3]$. Esto implica a su vez el aumento de $[CO_2(d)]$ en la sangre (reacción 2) y así aumenta la presión de $CO_2(g)$ en el espacio aéreo de los pulmones (reacción 3); el CO_2 sobrante se exhala. De manera inversa, cuando se aumenta el pH del plasma sanguíneo (por ejemplo, por la producción de NH_3 durante el catabolismo de las proteínas), tienen lugar los procesos opuestos: la $[H^+]$ del plasma sanguíneo desciende, haciendo que se disocie más H_2CO_3 en H^+ y HCO_3^- por lo que se disuelve más $CO_2(g)$ de los pulmones en el plasma sanguíneo. La velocidad de la respiración, esto es, la velocidad de inhalación y exhalación de CO_2, puede ajustar estos equilibrios rápidamente y mantener casi constante el pH de la sangre. El ritmo de la respiración se controla en el tronco cerebral, donde la detección de un aumento en la pCO_2 o un descenso en el pH de la sangre desencadena una respuesta que hace que la respiración sea más profunda y frecuente.

Al pH del plasma sanguíneo (7,4) hay poco H_2CO_3 presente en comparación con HCO_3^-, y la adición de una pequeña cantidad de base (NH_3 u OH^-) titularía todo el H_2CO_3, anulando la capacidad de tamponamiento. El importante papel del ácido carbónico ($pK_a = 3,57$ a 37 °C) en el tamponamiento del plasma sanguíneo (~pH 7,4) parece no estar de acuerdo con la anterior afirmación de que un tampón es más efectivo en el margen de 1 unidad de pH por debajo y por encima de su pK_a. La explicación de esta paradoja estriba en la gran reserva de $CO_2(d)$ en la sangre y en la rapidez con que establece su equilibrio con el H_2CO_3:

$$CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

Podemos definir una constante, K_h, que es la constante de equilibrio de la hidratación del CO_2:

$$K_h = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(d)]}$$

A continuación, con el fin de tener en cuenta la reserva de $CO_2(d)$, podemos expresar $[H_2CO_3]$ como $K_h[CO_2(d)]$, y sustituir esta expresión por $[H_2CO_3]$ en la ecuación de la disociación ácida de H_2CO_3:

$$K_a = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{K_h[CO_2(d)]}$$

Ahora, la constante de equilibrio global para la disociación de H_2CO_3 puede expresarse en estos términos:

$$K_hK_a = K_{combinada} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2(d)]}$$

Podemos calcular el valor de la nueva constante, $K_{combinada}$, y el correspondiente pK aparente, o $pK_{combinado}$, a partir de los valores determinados experimentalmente para K_h ($3,0 \times 10^{-3}$ M) y K_a ($2,7 \times 10^{-4}$ M) a 37 °C:

$$K_{combinada} = (3,0 \times 10^{-3}\ \text{M})(2,7 \times 10^{-4}\ \text{M})$$
$$= 8,1 \times 10^{-7}\ \text{M}^2$$

$$pK_{combinada} = 6,1$$

En medicina clínica es normal referirse a $CO_2(d)$ como el ácido conjugado y usar su pK_a aparente (o combinado) de 6,1 para simplificar el cálculo del pH a partir de $[CO_2(d)]$. Según esto,

$$pH = 6,1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{(0,23 \times pCO_2)}$$

donde pCO_2 se expresa en kilopascals (kPa; normalmente, pCO_2 está entre 4,6 y 6,7 kPa) y 0,23 es el correspondiente coeficiente de solubilidad del CO_2 en agua; de este modo, el término $0,23 \times pCO_2 \approx 1,2$ kPa. La $[HCO_3^-]$ del plasma es normalmente de 24 mM. ■

La diabetes no tratada produce acidosis que puede ser mortal

El plasma sanguíneo humano tiene normalmente un pH entre 7,35 y 7,45, y muchos de los enzimas que actúan en la sangre han evolucionado para tener su actividad máxima en este margen de pH. Aunque son muchos los aspectos de la estructura y función celulares influidos por el pH, es la actividad enzimática la que es especialmente sensible. Los enzimas tienen un máximo de actividad catalítica a un pH característico denominado **pH óptimo (Fig. 2–21)**. A ambos lados del pH óptimo su actividad catalítica desciende, a menudo de forma abrupta. Así, un pequeño cambio en el pH puede provocar una gran diferencia en la velocidad de alguna reacción crucial catalizada enzimáticamente. El control biológico del pH de las células y fluidos corporales es, por consiguiente, de importancia central en todos los aspectos del metabolismo y de las actividades celulares, por lo que cambios en el pH de la sangre tienen consecuencias fisiológicas marcadas (descritas en el recuadro 2–1).

En individuos con diabetes no tratada, la falta de insulina o la insensibilidad a su presencia (dependiente del tipo de diabe-

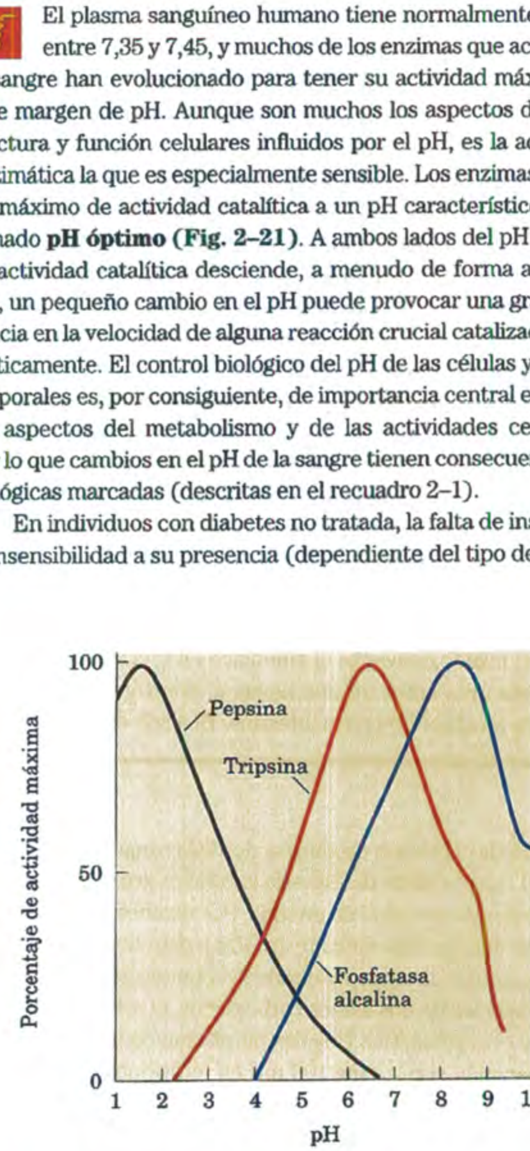


FIGURA 2–21 pH óptimos de algunos enzimas. La pepsina es un enzima digestivo secretado en el jugo gástrico, el cual tiene un pH de ~1,5 que permite una acción óptima de la pepsina. La tripsina, un enzima digestivo que actúa en el intestino delgado, tiene un pH óptimo que coincide con el pH neutro de la luz del intestino delgado. La fosfatasa alcalina del tejido óseo es un enzima hidrolítico que se cree que participa en la mineralización del hueso.

RECUADRO 2-1 MEDICINA Sobre ser su propio conejillo de Indias (¡no lo intente en casa!)

Ésta es una descripción de J.B.S. Haldane de experimentos fisiológicos sobre el control del pH de la sangre, extraída de su libro *Possible Worlds* (Harper and Brothers, 1928).

"Quise averiguar qué le ocurría a un hombre cuando se convertía en más ácido o más alcalino... Desde luego, podría haber intentado los experimentos en primer lugar con un conejo, puesto que ya se había hecho algún trabajo en esta línea; pero uno no puede estar nunca muy seguro de cómo se siente un conejo. De hecho, hay conejos que no quieren cooperar.

"... De modo que un colega humano y yo empezamos a experimentar, cada uno con el otro... Mi colega, el Dr. H.W. Davies, y yo nos hicimos más alcalinos forzando la respiración e ingiriendo hasta tres onzas de bicarbonato sódico. Nos hicimos ácidos encerrándonos en una habitación sellada que contenía entre un seis y un siete por ciento de dióxido de carbono en el aire. Esto le hace a uno respirar como si acabara de terminar una carrera de remo, produciendo a la vez un violento dolor de cabeza... Dos horas era el máximo que aguantábamos con el dióxido de carbono, incluso en el caso de que nuestra cámara de gas no hubiera retenido el olor inerradicable del "gas de la cruz amarilla", procedente de pretéritos experimentos de tiempos de guerra, que hacían que uno lloriqueara sólo por entrar en ella. Dada esta situación, lo más obvio era intentar beber algo de ácido clorhídrico. Si lo tomas tal cual, concentrado, te disuelve los dientes y te quema la lengua, pero lo que yo quería era hacer que se difundiera suavemente por mi cuerpo. Lo máximo que llegué a ingerir fue una parte de ácido comercial fuerte disuelta en cien de agua; tenía suficiente con un pinta de ese brebaje, que irritaba mi garganta y mi estómago, pero al mismo tiempo calculaba que necesitaba un galón y medio para obtener el efecto deseado... Pensé que si tomaba cloruro amónico, parte de él se disociaría en mi cuerpo, liberando clorhídrico. La idea era correcta... el hígado convierte el amoníaco en una sustancia inocua llamada urea antes de que llegue al corazón y al cerebro después de su absorción en el intestino. El ácido clorhídrico resultante se combina con el bicarbonato sódico, presente en todos los tejidos, produciendo cloruro sódico y dióxido de carbono. He observado en mí mismo la producción de este gas como consecuencia de este proceso, a la velocidad de seis cuartos de galón por hora (aunque no una hora entera a este ritmo)...

"Estaba bastante satisfecho de haber reproducido en mí mismo el tipo de déficit respiratorio que ocurre en los estados terminales de la enfermedad renal y de la diabetes. Desde hacía tiempo se sabía que eso era debido al envenenamiento por ácido, pero en todos los casos el envenenamiento por ácido se complica con otras anormalidades químicas y había bastantes dudas sobre cuáles de los síntomas eran debidos directamente al ácido.

"La escena cambia ahora a Heidelberg, donde Freudenberg y György estaban estudiando la tetania muscular en niños pequeños... se les ocurrió que podría ser interesante probar el efecto de aumentar de manera importante la acidez del cuerpo. Se había observado tetania de forma ocasional en pacientes que habían sido tratados por otras causas mediante grandes dosis de bicarbonato sódico o que habían perdido mucho ácido clorhídrico por vómitos constantes; por tanto, si la alcalinidad de los tejidos produce tetania muscular, es de esperar que la acidez la cure. Desgraciadamente, resulta difícil imaginar que se pueda curar a un niño moribundo encerrándolo en una habitación llena de ácido carbónico y aún menos que se le haga ingerir ácido clorhídrico; no se les ocurrió otra cosa que administrar sales de calcio, que no se absorben muy bien y que afectan la digestión, pero que ciertamente resultan beneficiosas en muchos casos de tetania muscular.

"Sin embargo, así que leyeron mi artículo sobre el cloruro amónico empezaron a administrarlo a los niños, y se sintieron encantados al comprobar que los síntomas desaparecían en cuestión de horas. Desde entonces se ha usado con éxito en Inglaterra y en América, tanto en niños como en adultos. No elimina la causa, pero hace que los pacientes mejoren hasta un punto desde el que es posible su recuperación."

---

tes), impide la captación de glucosa desde la sangre a los tejidos y obliga al uso por parte de éstos de los ácidos grasos almacenados como fuente primaria de energía. Por razones que describiremos con detalle más adelante (p. 914), esta dependencia de los ácidos grasos da como resultado la acumulación de grandes concentraciones de dos ácidos carboxílicos, el ácido β–hidroxibutírico y el acetoacético (niveles en plasma de 90 mg/100 mL en comparación con <3 mg/100 mL en individuos control (sanos); excreción urinaria de 5 g/24 h, comparada con <125 mg/24 h en los controles). La disociación de estos ácidos hace descender el pH sanguíneo a menos de 7,35, causando acidosis. La acidosis grave produce dolor de cabeza, somnolencia, náuseas, vómitos y diarrea, seguidos de aletargamiento, coma y convulsiones, presumiblemente como consecuencia de que algunos enzimas no funcionan óptimamente a pH bajo. Cuando a un paciente se le detectan niveles elevados de glucosa en sangre, pH plasmático bajo y niveles elevados de ácido β-hidroxibutírico y ácido acetoacético en sangre y orina, el diagnóstico más probable es diabetes mellitus.

Otros estados son también susceptibles de producir acidosis. El ayuno y la inanición fuerzan el uso de los ácidos grasos almacenados como fuente de energía, con las mismas consecuencias que la diabetes. El ejercicio muy intenso, como en los esprints de atletas o ciclistas, produce una acumulación temporal de ácido láctico en la sangre. El fallo renal disminuye la capacidad de regular los niveles de bicarbonato. Las enfermedades pulmonares (tales como el enfisema, la neumonía o el asma) reducen la capacidad de eliminar el CO_2 producido durante la oxidación de los combustibles en los tejidos, con la consiguiente acumulación de H_2CO_3. La acidosis se trata atacando las causas subyacentes: con insulina para personas afectadas de diabetes, y con esteroides o antibióticos para personas con enfermedades pulmonares. La acidosis grave puede revertirse administrando una disolución de bicarbonato por vía intravenosa. ■

EJEMPLO PRÁCTICO 2–7 Tratamiento de la acidosis con bicarbonato

¿Por qué aumenta el pH del plasma sanguíneo con la administración intravenosa de una disolución de bicarbonato?

Solución: La relación de concentraciones de H_2CO_3 y de CO_2(d) determina el pH del tampón bicarbonato según la ecuación:

$$pH = 6{,}1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{(0{,}23 \times pCO_2)}$$

Si la $[HCO_3^-]$ aumenta sin variación en la pCO_2, el pH aumentará.

RESUMEN 2.3 Tamponamiento contra cambios de pH en los sistemas biológicos

- Una mezcla de un ácido (o base) débil y su sal resiste los cambios de pH causados por la adición de H^+ u OH^-. Esta mezcla actúa como un tampón.
- El pH de una disolución de ácido débil (o base débil) y su sal se deduce de la ecuación de Henderson-Hasselbalch: $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$.
- En las células y los tejidos, los sistemas tampón de fosfato y bicarbonato mantienen los fluidos intracelulares y extracelulares en su pH óptimo (fisiológico), que es normalmente cercano a 7. Los enzimas suelen actuar de manera óptima a este pH.
- Los estados que hacen descender el pH de la sangre, produciendo acidosis, o que hacen que aumente, produciendo alcalosis, pueden poner en peligro la vida de las personas.

2.4 El agua como reactivo

El agua no es sólo el disolvente en el que tienen lugar las reacciones químicas de las células vivas; muy a menudo participa directamente en estas reacciones. La formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico constituye un ejemplo de una **reacción de condensación** en la que se eliminan los elementos del agua **(Fig. 2–22)**. La reacción inversa a ésta, rotura acompañada de la adición de los elementos del agua, es una **reacción de hidrólisis.** Las reacciones de hidrólisis son también responsables de la despolimerización enzimática de proteínas, glúcidos y ácidos nucleicos. Las reacciones de hidrólisis, catalizadas por enzimas denominados **hidrolasas,** son casi siempre exergónicas; al generar dos moléculas a partir de una conducen a un incremento en la entropía del sistema. La formación de polímeros celulares a partir de sus subunidades por simple inversión de la hidrólisis (es decir, mediante reacciones de condensación) sería endergónica, por lo que no tiene lugar. Como veremos, las células salvan este obstáculo termodinámico mediante el acoplamiento de reacciones de condensación endergónicas con procesos exergónicos, tales como la rotura del enlace anhídrido del ATP.

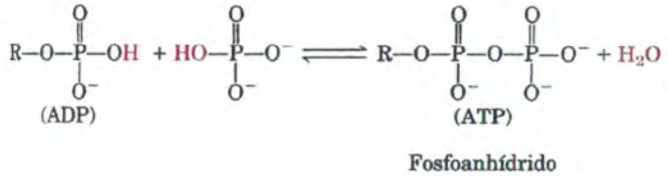


FIGURA 2–22 Participación del agua en reacciones biológicas. El ATP es un fosfoanhídrido formado por una reacción de condensación (pérdida de los elementos del agua) entre ADP y fosfato. R representa adenosina monofosfato (AMP). Esta reacción de condensación requiere energía. La hidrólisis (adición de los elementos del agua) del ATP para formar ADP y fosfato libera una cantidad equivalente de energía. Estas reacciones de condensación e hidrólisis del ATP son sólo un ejemplo del papel del agua como reactivo en procesos biológicos.

Al leer esto usted está (¡eso esperamos!) consumiendo oxígeno. El agua y el dióxido de carbono son los productos finales de la oxidación de combustibles tales como la glucosa. La reacción global de este proceso se puede resumir como:

$$\underset{\text{Glucosa}}{C_6H_{12}O_6} + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

El "agua metabólica" formada a partir de alimentos y grasas almacenadas es de hecho suficiente para permitir que algunos animales que viven en hábitats muy secos (jerbos, ratas canguro, camellos) sobrevivan sin beber agua durante largos períodos de tiempo.

El CO_2 producido por la oxidación de glucosa se convierte en los eritrocitos en la forma más soluble HCO_3^-, mediante una reacción catalizada por la enzima carbónico anhidrasa:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

En esta reacción, el agua no es sólo un sustrato sino que actúa en un proceso de transferencia de protones formando una red de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno a través de las que se produce un salto de protones (Fig. 2–13).

Las plantas y algas verdes utilizan la energía de la luz solar para romper el agua en el proceso de la fotosíntesis:

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{luz}} O_2 + 2AH_2$$

En esta reacción, A es una especie aceptora de electrones que varía según el tipo de organismo fotosintético y el agua actúa de dador de electrones en una secuencia de oxidación-reducción (véase la Fig. 19–57) que es fundamental para el desarrollo de toda forma de vida.

RESUMEN 2.4 El agua como reactivo

- El agua es a la vez el disolvente en el que tienen lugar las reacciones metabólicas y un reactivo que interviene en muchos procesos bioquímicos, entre los que se incluyen las reacciones de hidrólisis, de condensación y de oxidación-reducción.

2.5 La adecuación del ambiente acuoso a los organismos vivos

Los organismos se han adaptado de manera efectiva a su ambiente acuoso e incluso han desarrollado medios para aprovechar las inusuales propiedades del agua. El alto calor específico

del agua (el calor necesario para elevar en 1 °C la temperatura de 1 g de agua) es útil para las células y organismos porque permite que el agua actúe como un "tampón térmico", permitiendo que la temperatura de un organismo permanezca relativamente constante cuando varía la temperatura del aire o se genera calor como subproducto del metabolismo. Además, algunos vertebrados aprovechan el elevado calor de vaporización del agua (Tabla 2–1) utilizando (es decir, perdiendo) exceso de calor corporal al evaporar el sudor. El alto grado de cohesión interna del agua líquida, debido a los enlaces de hidrógeno, es aprovechado por las plantas como medio para transportar nutrientes disueltos desde las raíces a las hojas durante el proceso de la transpiración. Incluso la densidad del hielo, menor que la del agua líquida, tiene consecuencias biológicas importantes en los ciclos vitales de los organismos acuáticos. Los estanques se congelan desde arriba hacia abajo y la capa de hielo de la parte superior aísla el agua de debajo del aire frígido, impidiendo que el estanque (y los organismo que hay en él) se congelen. De gran importancia para todos los organismos vivos es el hecho de que muchas propiedades físicas y biológicas de las macromoléculas celulares, especialmente las proteínas y los ácidos nucleicos, provienen de sus interacciones con moléculas de agua del medio circundante. La influencia del agua en el curso de la evolución biológica ha sido profunda y determinante. Si han aparecido formas de vida en otras partes del universo, es improbable que se parezcan a las de la Tierra, a menos que su origen extraterrestre sea también un lugar en el que haya grandes cantidades de agua líquida disponibles.

Los medios acuosos dan cobijo a multitud de especies. Los corales blandos, esponjas, briozoos y algas se disputan el espacio en este arrecife de las Islas Filipinas.

Palabras clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

enlace de hidrógeno 44
energía de enlace 44
hidrofílico 46
hidrofóbico 46
anfipático 48
micela 48
interacciones hidrofóbicas 49
fuerzas de London 49
interacciones de van der Waals 49
osmolaridad 52
ósmosis 52
isotónico 52
hipertónico 52
hipotónico 52
constante de equilibrio (K_{eq}) 55
producto iónico del agua (K_w) 55
pH 56
acidosis 57
alcalosis 57
par ácido-base conjugado 57
constante de disociación (K_a) 58
pK_a 58
curva de titulación 58
tampón 59
región de tamponamiento 60
ecuación de Henderson-Hasselbalch 60
condensación 65
hidrólisis 65

Bibliografía

General

Belton, P.S. (2000) Nuclear magnetic resonance studies of the hydration of proteins and DNA. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 993–998.

Denny, M.W. (1993) *Air and Water: The Biology and Physics of Life's Media*, Princeton University Press, Princeton, NJ.
Una maravillosa investigación sobre la importancia biológica de las propiedades del agua.

Eisenberg, D. & Kauzmann, W. (1969) *The Structure and Properties of Water*, Oxford University Press, New York.
Clásico tratado avanzado de la química física del agua y las interacciones hidrofóbicas.

Franks, F. & Mathias, S.F. (eds). (1982) *Biophysics of Water*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
Extensa colección de artículos sobre la estructura del agua pura y del citoplasma.

Gerstein, M. & Levitt, M. (1998) Simulating water and the molecules of life. *Sci. Am.* **279** (November), 100–105.
Descripción bien ilustrada del uso de la simulación por ordenador para estudiar la biológicamente importante asociación del agua con las proteínas y ácidos nucleicos.

Kandori, H. (2000) Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 177–191.
Revisión de nivel intermedio sobre el papel de una cadena interna de moléculas de agua en el movimiento de protones a través de esta proteína.

Kornblatt, J. & Kornblatt, J. (1997) The role of water in recognition and catalysis by enzymes. *The Biochemist* **19** (3), 14–17.
Breve y útil resumen de las formas en que el agua unida influencia la estructura y actividad de las proteínas.

Kuntz, I.D. & Zipp, A. (1977) Water in biological systems. *N. Engl. J. Med.* **297**, 262–266.
Breve revisión del estado físico del agua citosólica y sus interacciones con las biomoléculas disueltas.

Luecke, H. (2000) Atomic resolution structures of bacterio-rhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 133–156.

Revisión de carácter avanzado sobre una bomba de protones que utiliza una cadena interna de moléculas de agua.

Nicolls, P. (2000) Introduction: the biology of the water molecule. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 987–992.

Revisión corta sobre las propiedades del agua, que sirve de introducción a otras excelentes revisiones avanzadas publicadas en el mismo número de la revista (véanse en especial las de Pocker, 2000, y Rand et al., 2000, referidas más abajo).

Symons, M.C. (2000) Spectroscopy of aqueous solutions: protein and DNA interactions with water. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 999–1007.

Westhof, E. (ed.) (1993) *Water and Biological Macromolecules*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Catorce capítulos, cada uno de ellos de un autor diferente, que cubren (a un nivel avanzado) la estructura del agua y sus interacciones con las proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos.

Wiggins, P.M. (1990) Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* **54**, 432–449.

Revisión sobre el agua en la biología, incluida una discusión sobre la estructura física del agua líquida, sus interacciones con las biomoléculas y el estado del agua en las células vivas.

Ósmosis

Cayley, D.S., Guttman, H.J., & Record, M.T., Jr. (2000) Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys. J.* **78**, 1748–1764.

Investigación física avanzada sobre la fracción de agua citoplasmática de la bacteria *Escherichia coli* cultivada en medios de diferente osmolaridad. (Véase también más abajo Record et al., 1998.)

Rand, R.P., Parsegian, V.A., & Rau, D.C. (2000) Intracellular osmotic action. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1018–1032.

Revisión sobre el papel del agua en la catálisis enzimática a partir de estudios con solutos pobres en agua.

Record, M.T., Jr., Courtenay, E.S., Cayley, D.S., & Guttman, H.J. (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 143–148.

Revisión de nivel intermedio sobre las maneras en que una célula bacteriana compensa los cambios en la osmolaridad del entorno. (Véase también más arriba Cayley et al., 2000.)

Zonia, L., & Munnik, T. (2007) Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function. *Trends Plant Sci.* **12**, 90–97.

Interacciones débiles en los sistemas acuosos

Chaplin, M. (2006) Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* **7**, 861–866.

Fersht, A.R. (1987) The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 301–304.

Discusión cuantitativa, clara y concisa sobre la contribución de los enlaces de hidrógeno al reconocimiento molecular y la catálisis enzimática.

Frieden, E. (1975) Non-covalent interactions: key to biological flexibility and specificity. *J. Chem. Educ.* **52**, 754–761.

Revisión de las cuatro clases de interacciones débiles que estabilizan las macromoléculas y les confieren especificidad biológica. Contiene ejemplos claros.

Jeffrey, G.A. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, New York.

Discusión avanzada y detallada de la estructura y propiedades de los enlaces de hidrógeno, incluidos los presentes en el agua y en las macromoléculas.

Ladbury, J. (1996) Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem. Biol.* **3**, 973–980.

Levy, Y. & Onuchic, J.N. (2006) Water mediation in protein folding and molecular recognition. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 389–415.

Discusión avanzada sobre el papel del agua en la estructura de proteínas.

Martin, T.W. & Derewenda, Z.S. (1999) The name is bond—H bond. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 403–406.

Breve revisión acerca del carácter parcialmente covalente de los enlaces de hidrógeno.

Pocker, Y. (2000) Water in enzyme reactions: biophysical aspects of hydration-dehydration processes. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1008–1017.

Discusión sobre el papel del agua en la catálisis enzimática, tomando la carbónico anhidrasa como ejemplo.

Schwabe, J.W.R. (1997) The role of water in protein-DNA interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 126–134.

Examina el importante papel del agua tanto en la especificidad como en la afinidad de las interacciones proteína-DNA.

Stillinger, F.H. (1980) Water revisited. *Science* **209**, 451–457.

Breve revisión de la estructura física del agua, que incluye la importancia del enlace de hidrógeno y la naturaleza de las interacciones hidrofóbicas.

Tanford, C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* **200**, 1012–1018.

Revisión clásica de las bases químicas y energéticas de las interacciones hidrofóbicas entre biomoléculas en solución acuosa.

Ácidos débiles, bases débiles y tampones: problemas para practicar

Segel, I.H. (1976) *Biochemical Calculations*, 2nd edn, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Problemas

1. Solubilidad del etanol en agua Explique por qué el etanol (CH_3CH_2OH) es más soluble en agua que el etano (CH_3CH_3).

2. Cálculo del pH a partir de la concentración de ión hidrógeno ¿Cuál es el pH de una disolución que tiene una concentración de H^+ de (a) $1{,}75 \times 10^{-5}$ mol/L; (b) $6{,}50 \times 10^{-10}$ mol/L; (c) $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol/L; (d) $1{,}50 \times 10^{-5}$ mol/L?

3. Cálculo de la concentración de ión hidrógeno a partir del pH ¿Cuál es la concentración de H^+ de una disolución de pH (a) 3,82; (b) 6,52; (c) 11,11?

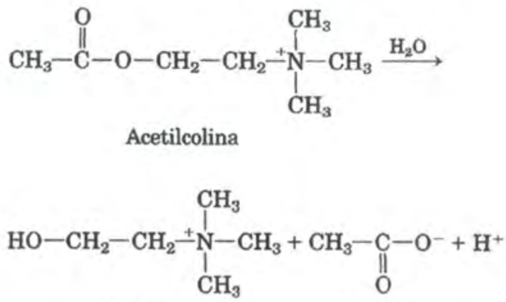
4. Acidez del HCl gástrico En un laboratorio hospitalario se tituló hasta neutralidad con NaOH 0,1 M una muestra de 10,0 mL de jugo gástrico obtenido varias horas después de una comida; se necesitaron 7,2 mL de NaOH. El estómago del paciente no contenía comida ni bebida ingerida por lo que se puede suponer que no había tampones presentes. ¿Cuál era el pH del jugo gástrico?

5. Cálculo del pH de un ácido o base fuertes (a) Escriba la reacción de disociación ácida del ácido clorhídrico. (b) Calcule el pH de una disolución de HCl $5{,}0 \times 10^{-4}$ M. (c) Escriba la reacción de disociación ácida del hidróxido de sodio. (d) Calcule el pH de una disolución de NaOH $7{,}0 \times 10^{-5}$ M.

6. Cálculo del pH a partir de la concentración de ácido fuerte Calcule el pH de una disolución preparada por dilución de 3,0 mL de HCl 2,5 M hasta un volumen final de 100 mL con H_2O.

7. Medida de los niveles de acetilcolina por cambios del pH La concentración de la acetilcolina (un neurotransmisor) en una muestra se puede determinar a partir de los cambios de pH que acompañan a su hidrólisis. Cuando se incuba la muestra con el enzima acetilcolinesterasa, la acetilcolina se convierte cuanti-

tativamente en colina y ácido acético, el cual se disocia produciendo acetato y un ión hidrógeno:



En un análisis típico, una muestra de 15 mL de una solución acuosa que contenía una cantidad desconocida de acetilcolina tenía un pH de 7,65. Cuando se incubó con acetilcolinesterasa, el pH de la solución descendió hasta 6,87. Suponiendo que no había tampón en la mezcla de ensayo, determine el número de moles de acetilcolina en los 15 mL de la muestra.

8. Significado físico del pK_a ¿Cuál de las disoluciones acuosas siguientes tiene el pH más bajo: HCl 0,1 M; ácido acético 0,1 M (pK_a = 4,86); ácido fórmico 0,1 M (pK_a = 3,75)?

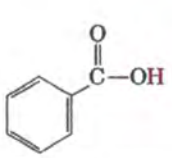
9. Vinagre artificial Una forma de preparar vinagre (*no* la más recomendable) consiste en hacer una disolución de ácido acético, único componente ácido del vinagre, al pH adecuado (véase la Fig. 2–14) y añadir agentes saborizantes adecuados. El ácido acético (M_r 60) es líquido a 25 °C con una densidad de 1,049 g/mL. Calcule el volumen que se debe añadir a agua destilada para hacer 1 L de vinagre artificial (véase la Fig. 2–15).

10. Identificación de la base conjugada ¿Cuál es la base conjugada en cada uno de los pares de compuestos siguientes?

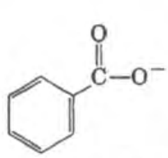
(a) RCOOH, $RCOO^-$ (c) $H_2PO_4^-$, H_3PO_4
(b) RNH_2, RNH_3^+ (d) H_2CO_3, HCO_3^-

11. Cálculo del pH de una mezcla de un ácido débil y su base conjugada Calcule el pH de una disolución diluida que contiene una relación molar de acetato potásico: ácido acético (pK_a = 4,76) de (a) 2:1; (b) 1:3; (c) 5:1; (d) 1.1; (e) 1:10.

12. Efecto del pH sobre la solubilidad La naturaleza fuertemente polar y formadora de enlaces de hidrógeno del agua hace que sea un disolvente excelente para las especies iónicas (cargadas). Por contra, las moléculas orgánicas apolares no ionizadas, tales como el benceno, son relativamente insolubles en agua. En principio, la solubilidad en agua de cualquier ácido o bases orgánicas se puede incrementar mediante la conversión de las moléculas en especie cargadas. Por ejemplo, la solubilidad del ácido benzoico en agua es baja. La adición de bicarbonato sódico a una mezcla de agua y ácido benzoico aumenta el pH y desprotona el ácido benzoico formando el ión benzoato, que es bastante soluble en agua.

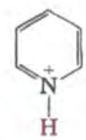


Ácido benzoico
pK_a ≈ 5



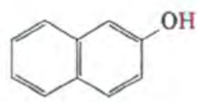
Ión benzoato

¿Son los siguientes compuestos más solubles en una disolución acuosa de NaOH 0,1M o de HCl 0,1 M? (Los protones disociables se señalan en rojo.)



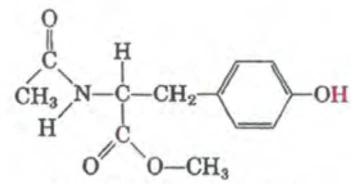
Ión piridina
pK_a ≈ 5

(a)



β-Naftol
pK_a ≈ 10

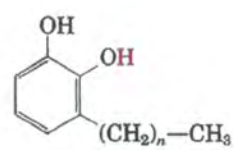
(b)



N-Acetiltirosina metil éster
pK_a ≈ 10

(c)

13. Tratamiento de la urticaria por hiedra venenosa Los componentes de la hiedra y el roble venenosos que producen la urticaria característica son catecoles sustituidos con grupos alquilo de cadena larga.

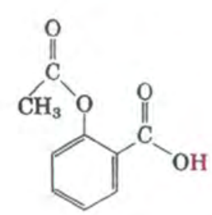


pK_a ≈ 8

Si hubiera estado expuesto a la acción de la hiedra venenosa, ¿cuál de los tratamientos siguientes aplicaría al área afectada? Justifique su elección.

(a) Lavar el área con agua fría.
(b) Lavar el área con vinagre diluido o zumo de limón.
(c) Lavar el área con agua y jabón.
(d) Lavar el área con jabón, agua y bicarbonato sódico.

14. pH y absorción de fármacos La aspirina es un ácido débil con un pK_a de 3,5:



Se absorbe a la sangre a través de las células que cubren el estómago y el intestino delgado. La absorción implica el paso a través de la membrana plasmática, la velocidad del cual viene determinada por la polaridad de la molécula: las moléculas cargadas y muy polares pasan lentamente, mientras que las que son hidrofóbicas y neutras pasan rápidamente. El pH del contenido del estómago es alrededor de 1,5 y el pH del contenido del intestino delgado es alrededor de 6. ¿Se absorbe más aspirina hacia el torrente sanguíneo en el estómago o en el intestino delgado? Justifique claramente su elección.

15. Cálculo del pH a partir de concentraciones molares ¿Cuál es el pH de una disolución que contiene 0,12 mol/L de NH_4Cl y 0,03 mol/L de NaOH (el pK_a de NH_4^+/NH_3 es de 9,25)?

16. Cálculo del pH después de la titulación de un ácido débil Un compuesto tiene un pK_a de 7,4. Se añaden 30 mL de ácido clorhídrico 1,0 M a 100 mL de una disolución 1,0 M del compuesto a pH 8,0. ¿Cuál es el pH de la disolución resultante?

17. Propiedades de un tampón El aminoácido glicina se utiliza a menudo como principal ingrediente de un tampón en experimentos bioquímicos. El grupo amino de la glicina, que tiene un pK_a de 9,6, puede existir en la forma protonada ($—NH_3^+$) o como base libre ($—NH_2$) debido al equilibrio reversible

$$R{-}NH_3^+ \rightleftharpoons R{-}NH_2 + H^+$$

(a) ¿En qué intervalo de pH puede utilizarse la glicina como tampón eficiente gracias a su grupo amino?

(b) En una disolución 0,1 M de glicina a pH 9,0, ¿qué fracción de la glicina tiene su grupo amino en la forma $—NH_3^+$?

(c) ¿Qué cantidad de KOH 5 M debe añadirse a 1,0 L de glicina 0,1 M a pH 9,0 para llevar su pH exactamente a 10,0?

(d) Cuando el 99% de la glicina está en su forma $—NH_3^+$, ¿cuál es la relación numérica entre el pH de la solución y el pK_a del grupo amino?

18. Preparación de un tampón fosfato ¿Qué relación molar de HPO_4^{2-} y $H_2PO_4^-$ produciría un pH de 7,0 en disolución? El ácido fosfórico (H_3PO_4), un ácido triprótico, tiene tres valores de pK_a: 2,14, 6,86 y 12,4. Sugerencia: solamente uno de los valores de pK_a tiene importancia en este caso.

19. Preparación de un tampón estándar para la calibración de un pHmetro El electrodo de vidrio utilizado en los pH-metros comerciales da una respuesta eléctrica proporcional a la concentración de ión hidrógeno. Para convertir estas respuestas en pH, deben calibrarse los electrodos de vidrio frente a disoluciones estándar de concentración de H^+ conocida. Determínese el peso en gramos de dihidrógeno fosfato sódico ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; masa molecular total (FW) 138) y de hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4; FW 142) necesarios para preparar 1 L de un tampón estándar a pH 7,00 con una concentración total de fosfato de 0,100 M (véase la Figura 2–15). Consulte en el problema 18 los valores de pK_a del ácido fosfórico.

20. Cálculo de las relaciones molares de base conjugada y ácido débil a partir del pH Calcule la relación entre base conjugada y ácido a pH 5,0 para un ácido débil con un pK_a de 6,0.

21. Preparación de un tampón de concentración y pH conocidos Dadas dos disoluciones a 0,10 M de ácido acético (pK_a = 4,76) y acetato sódico, describa cómo prepararía 1,0 L de tampón acetato 0,10 M a pH 4,00.

22. Elección del ácido débil para un tampón ¿Cuál de los compuestos siguientes sería el mejor tampón a pH 5,0: ácido fórmico (pK_a = 3,8), ácido acético (pK_a = 4,76) o etilamina (pK_a = 9,0)? Justifique brevemente su respuesta.

23. Trabajando con tampones Un tampón contiene 0,010 moles de ácido láctico (pK_a = 3,86) y 0,050 moles de lactato sódico por litro. (a) Calcule el pH del tampón. (b) Calcule el cambio en el pH cuando se añade 5 mL de HCl 0,5 M a 1 L del tampón. (c) ¿Qué cambio en el pH se esperaría si se añadiera la misma cantidad de HCl a 1 L de agua pura?

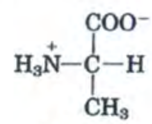
24. Uso de las concentraciones molares para calcular el pH ¿Cuál es el pH de una disolución que contiene 0,20 M de acetato sódico y 0,60 M de ácido acético (pK_a = 4,76)?

25. Preparación de un tampón acetato Calcule las concentraciones de ácido acético (pK_a = 4,76) y de acetato sódico necesarias para preparar una disolución tampón 0,2 M a pH 5,0.

26. pH de la secreción defensiva de un insecto Ha estado observando a un insecto que se defiende de sus enemigos secretando un líquido cáustico. El análisis del líquido muestra que contiene una concentración total de formiato y ácido fórmico ($K_a = 1{,}8 \times 10^{-4}$) de 1,45 M; la concentración de ión formiato es de 0,015 M. ¿Cuál es el pH de la secreción?

27. Cálculo del pK_a Se cree que un compuesto X desconocido tiene un grupo carboxílico con un pK_a de 2,0 y otro grupo ionizable con un pK_a comprendido entre 5 y 8. Cuando se añaden 75 mL de NaOH 0,1 M a 100 mL de una disolución 0,1 M de X a pH 2,0, el pH aumenta hasta 6,72. Calcule el pK_a del segundo grupo ionizable de X.

28. Formas iónicas de la alanina La alanina es un ácido diprótico que experimenta dos reacciones de disociación (compruebe los valores de pK_a en la tabla 3–1). (a) Dada la estructura de la forma parcialmente protonada (o zwitterion; véase la Fig. 3–9) de la figura que se muestra a continuación, dibuje las estructuras de las otras dos formas que predominan en disolución acuosa: la completamente protonada y la completamente desprotonada.



Alanina

De las tres formas posibles, ¿cuál estaría a mayor concentración en disoluciones con los siguientes valores de pH: (b) 1,0; (c) 6,2; (d) 8,02; (e) 11,9? Explique sus respuestas en términos de pH relativo a los dos valores de pK_a.

29. Control del pH sanguíneo por la velocidad de respiración

(a) La presión parcial de CO_2 en los pulmones puede variar rápidamente con la velocidad y profundidad de la respiración. Por ejemplo, un remedio común para aliviar el hipo es incrementar la concentración de CO_2 en los pulmones. Esto se puede conseguir conteniendo la respiración, respirando escasamente y de forma lenta (hipoventilación) o respirando dentro de una bolsa de papel. En tales condiciones, la presión parcial de CO_2 en el espacio de aire de los pulmones aumenta por encima de la normal. Explique cualitativamente el efecto de este proceder sobre el pH sanguíneo.

(b) Una práctica común de los corredores de distancias cortas es respirar rápida y profundamente (hiperventilación) durante aproximadamente medio minuto para eliminar el CO_2 de los pulmones justo antes de correr, por ejemplo, un sprint de 100 m. El pH de su sangre puede aumentar a 7,6. Explique por qué aumenta el pH de la sangre.

(c) Durante una carrera de corta distancia los músculos producen gran cantidad de ácido láctico ($CH_3CH(OH)COOH$; $K_a = 1{,}38 \times 10^{-4}$ M) a partir de sus depósitos de glucosa. En vista de ello, ¿por qué puede ser útil una hiperventilación antes de un sprint?

30. Cálculo del pH de la sangre a partir de los niveles de CO_2 y bicarbonato Calcule el pH de una muestra de plasma sanguíneo con concentraciones totales de CO_2 y de bicarbonato de 26,9 mM y de 25,6 mM, respectivamente. Recuerde de la página 63 que el pK_a relevante del ácido carbónico es 6,1.

31. Aguantar la respiración y su efecto sobre el pH de la sangre El pH del líquido extracelular se mantiene mediante el sistema bicarbonato/ácido carbónico. Aguantar la respiración puede incrementar la concentración de $CO_2(g)$ en la sangre. ¿Qué efecto puede tener esto sobre el pH del líquido extracelular? Explíquelo mostrando la o las ecuaciones de equilibrio implicadas en este sistema.

Problemas de análisis de datos

32. Tensioactivos "activables" Las moléculas hidrofóbicas no se disuelven bien en agua. Al ser ésta un disolvente muy común, ciertos procesos son muy difíciles: lavar platos con residuos muy grasientos, eliminar petróleo derramado, mezclar bien las fases acuosa y aceitosa de un aliño de ensalada o llevar a cabo reacciones con componentes hidrofóbicos e hidrofílicos.

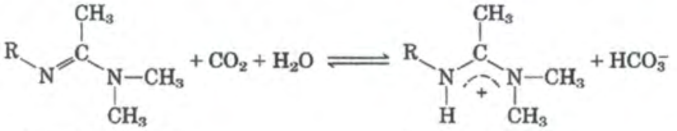
Los tensioactivos (surfactantes) son una clase de compuestos anfipáticos que incluye a los jabones, detergentes y emulsionantes. Con el uso de tensioactivos es posible suspender compuestos hidrofóbicos en disolución acuosa formando micelas (véase la Fig. 2–7). Una micela tiene un núcleo hidrofóbico que contiene el compuesto hidrofóbico y las "colas" hidrofóbicas del tensioactivo; las "cabezas" hidrofílicas del tensioactivo cubren la superficie de la micela. Se denomina emulsión a una suspensión de micelas. Cuanto más hidrofílico sea el grupo de la cabeza del tensioactivo, más poderoso será y mayor será su capacidad de emulsión de material hidrofóbico.

Cuando se usa jabón para quitar la grasa de platos sucios, el jabón forma una emulsión con la grasa, que se elimina con agua gracias a la interacción con la cabeza hidrofílica de las moléculas de jabón. También se utiliza detergente para emulsionar petróleo derramado y eliminarlo con agua. Y los emulsionantes de los aliños comerciales de ensaladas mantienen el aceite como suspensión homogénea en toda la mezcla acuosa.

En muchas situaciones sería útil disponer de un tensioactivo "activable": una molécula que pudiera ser convertida de tensioactivo a no tensioactivo de manera reversible.

(a) Imagine que existe este supuesto tensioactivo "activable". ¿Cómo lo utilizaría para limpiar y después recuperar el petróleo procedente de un vertido?

Liu y colaboradores describieron un tensioactivo activable prototípico en su artículo de 2006 "Tensioactivos activables". La activación se basa en la reacción siguiente:



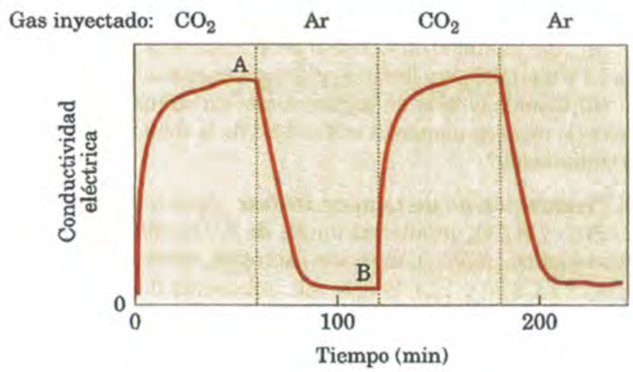
Forma amidina — Forma amidinio

(b) Dado que el pK_a de un ión amidinio típico es de 12,4 ¿hacia qué dirección (bien hacia la derecha o bien hacia la izquierda) esperaría que se desplazara el equilibrio de la reacción anterior? (Compruebe los valores de pK_a en la Fig. 2–16.) Justifique su respuesta. Pista: tenga presente la reacción $H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$.

Liu y colaboradores produjeron un tensioactivo activable para el que $R = C_{16}H_{33}$. En su artículo no dan ningún nombre a la molécula; para hacerlo corto le llamaremos s–tens.

(c) La forma amidinio de s–tens es un tensioactivo potente; la forma amidina no lo es. Explique esta observación.

Liu y colaboradores encontraron que podían cambiar de una forma de s–tens a otra variando el gas que inyectaban a través de una disolución de tensioactivo. Demostraron esta transición midiendo la conductividad eléctrica de la disolución de s-tens; las disoluciones acuosas de compuestos iónicos tienen mayor conductividad que las de compuestos no iónicos. Empezaron con una disolución de la forma amidina de s–tens en agua. Sus resultados se muestran debajo; las líneas de puntos indican el paso de un gas a otro.



(d) ¿En qué forma se encuentra la mayoría de s–tens en el punto A? ¿Y en el punto B?

(e) ¿Por qué aumenta la conductividad desde tiempo 0 hasta el punto A?

(f) ¿Por qué cae la conductividad entre el punto A y el punto B?

(g) Explique cómo emplearía s–tens para limpiar y recuperar el petróleo de un vertido.

Referencia

Liu, Y., Jessop, P.G., Cunningham, M., Eckert, C.A., & Liotta, C.L. (2006) *Science* **313**, 958–960.

> Quisiera que la palabra que le propongo, proteína... se entendiera como derivada de *proteios*, porque describe a la sustancia primitiva o principal de la nutrición animal que las plantas elaboran para los herbívoros y que estos últimos proporcionan a los carnívoros.
>
> – *J.J. Berzelius*, carta a G.J. Mulder, *1838*

3

Aminoácidos, péptidos y proteínas

Las proteínas intervienen en prácticamente todos los procesos que tienen lugar en la célula y ejercen una diversidad casi inagotable de funciones. En la exploración de los mecanismos moleculares de un proceso biológico, el bioquímico debe estudiar una o más proteínas. Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes y se hallan en todas las células y en todas las partes de la célula. Las proteínas también presentan una gran variedad; en una sola célula pueden haber miles de proteínas diferentes. Siendo los árbitros de las funciones moleculares, las proteínas son los productos finales más importantes de las rutas de información que se discuten en la Parte III de este libro. Las proteínas son los instrumentos moleculares mediante los que se expresa la información genética.

La clave de la estructura de los miles de proteínas diferentes se encuentra en unas subunidades monoméricas relativamente simples. Todas las proteínas, tanto si provienen de los linajes bacterianos más antiguos como de las formas de vida más complejas, están construidas a partir del mismo conjunto ubicuo de 20 aminoácidos, unidos de forma covalente en secuencias lineales características. Puesto que cada uno de estos aminoácidos tiene una cadena lateral propia que determina sus propiedades químicas, se puede considerar a este grupo de 20 moléculas precursoras como el alfabeto en el que está escrito el lenguaje de la estructura proteica. Las proteínas se presentan en una gran variedad de tamaño, desde péptidos relativamente pequeños compuestos por unos pocos residuos aminoácidos a polímeros enormes de masas moleculares del orden de millones.

Lo que resulta más sorprendente es que las células puedan producir proteínas con propiedades y actividades muy diferentes uniendo los mismos 20 aminoácidos en multitud de combinaciones y secuencias diferentes. A partir de estos bloques estructurales los diferentes organismos pueden fabricar productos tan diversos como enzimas, hormonas, anticuerpos, transportadores, fibras musculares, la proteína del cristalino del ojo, plumas, telarañas, cuernos de rinoceronte, proteínas de la leche, antibióticos, venenos de hongos y una pléyade de otras sustancias con actividades biológicas distintas **(Fig. 3–1)**. Los enzimas son los productos proteicos más variados y especializados. Prácticamente todas las reacciones celulares están catalizadas por enzimas.

La estructura y función de las proteínas es el tema de este capítulo y de los tres siguientes. Se describen las propiedades químicas fundamentales de los aminoácidos, péptidos y proteínas, y cómo un bioquímico trabaja con proteínas.

FIGURA 3–1 Algunas funciones de las proteínas. **(a)** La luz producida por las luciérnagas es el resultado de una reacción en que interviene la proteína luciferina y ATP, catalizada por el enzima luciferasa (véase el Recuadro 13–1). **(b)** Los eritrocitos contienen grandes cantidades de la proteína transportadora de oxígeno hemoglobina. **(c)** La proteína queratina, producida por todos los vertebrados, es el componente estructural principal del pelo, escamas, cuernos, lana, uñas y plumas. El rinoceronte negro está casi extinguido en estado salvaje debido a la creencia en algunas partes del mundo de que un polvo derivado de su cuerno tiene propiedades afrodisíacas. En realidad, las propiedades químicas del polvo de cuerno de rinoceronte no son diferentes del de las pezuñas de bóvidos o de las uñas humanas.

3.1 Aminoácidos

Arquitectura de proteínas – Aminoácidos Las proteínas son polímeros de aminoácidos, en los que cada **residuo aminoácido** está unido al siguiente a través de un tipo específico de enlace covalente. (El término "residuo" refleja la pérdida de los elementos del agua cuando un aminoácido se une a otro.) Las proteínas se pueden degradar (hidrolizar) hasta sus aminoácidos constituyentes mediante diversos métodos, por lo que los estudios iniciales sobre las proteínas se centraron en los aminoácidos libres procedentes de las mismas. Veinte son los aminoácidos comúnmente encontrados en las proteínas. El primer aminoácido descubierto fue la asparagina en 1806. El último de los 20 que se encontró fue la treonina, en 1938. Todos los aminoácidos tienen nombres comunes o triviales que, en algunos casos, provienen de la fuente de la cual se aislaron inicialmente. La asparagina se encontró por primera vez en el espárrago y el glutamato se encontró en el gluten de trigo; la tirosina se aisló por primera vez del queso (así su nombre proviene del griego *tyros*, "queso"); y la glicina (del griego *glykos*, "dulce") se denominó así debido a su sabor dulce.

Los aminoácidos tienen características estructurales comunes

Los 20 aminoácidos estándar encontrados en las proteínas son α-aminoácidos. Tienen todos un grupo carboxilo y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono (el carbono α) **(Fig. 3–2)**. Difieren unos de otros en sus cadenas laterales, o **grupos R,** que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica y que influyen en su solubilidad en agua. Además de estos 20 aminoácidos existen muchos más que se encuentran con menor frecuencia. Algunos son residuos que han sido modificados después de la síntesis de la proteína; otros se hallan en organismos vivos pero no como unidades constituyentes de las proteínas. A los aminoácidos estándar se les han asignado abreviaturas de tres letras y símbolos de una sola letra (Tabla 3–1) que se utilizan para indicar de manera abreviada la composición y secuencia de aminoácidos polimerizados en las proteínas.

CONVENCIÓN CLAVE: El código de tres letras es transparente: las abreviaturas consisten generalmente en las tres primeras letras del nombre del aminoácido. El código de una letra fue propuesto por Margaret Oakley Dayhoff (1925–1983), considerada por muchos como la fundadora del campo de la bioinformática. El código de una sola letra es la consecuencia del intento de reducir el tamaño de los archivos de datos (en la era en que se usaban fichas agujereadas) utilizados para la descripción de las secuencias de aminoácidos. Se diseñó para ser memorizada fácilmente y la descripción de su origen puede ser útil al estudiante. La primera letra del nombre del aminoácido es única para seis de ellos (CHIMSV), por lo que se utiliza directamente

Margaret Oakley Dayhoff
1925–1983

como su símbolo. Para otros cinco aminoácidos (AGLPT), la primera letra no es única y se asigna al aminoácido más frecuente en proteínas (por ejemplo, la leucina es más frecuente que la lisina). En el caso de otros cuatro, la letra utilizada es fonéticamente sugestiva en idioma inglés (RFYW: aRginina, Fenilalanina, tYrosina, trWiptófano). El resto fueron de asignación más difícil. Cuatro de ellos (DNEQ) recibieron letras contenidas en sus nombres o sugerencias por ellos (aspárDico, asparagiNa, glutamEato, Q-tamina – por glutamina). Restaba la lisina. De las pocas letras no usadas del alfabeto se escogió la K, que es la más próxima a L. ■

En todos los aminoácidos estándar excepto la glicina, el carbono α está unido a cuatro grupos diferentes: un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo R y un átomo de hidrógeno (Fig. 3–2; en la glicina el grupo R es otro átomo de hidrógeno). El átomo de carbono α es por tanto un **centro quiral** (p. 16). Debido al ordenamiento tetraédrico de los orbitales de enlace alrededor del átomo de carbono α, los cuatro grupos diferentes pueden ocupar dos ordenamientos diferentes en el espacio, por lo que los aminoácidos pueden aparecer en forma de dos estereoisómeros. Al ser imágenes especulares no superponibles entre sí

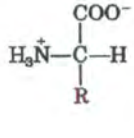


FIGURA 3–2 Estructura general de un aminoácido. Esta estructura es común a todos los α-aminoácidos, con una única excepción. (La excepción es la prolina, un aminoácido cíclico.) El grupo R o cadena lateral (en rojo) unido al carbono α (azul) es diferente para cada aminoácido.

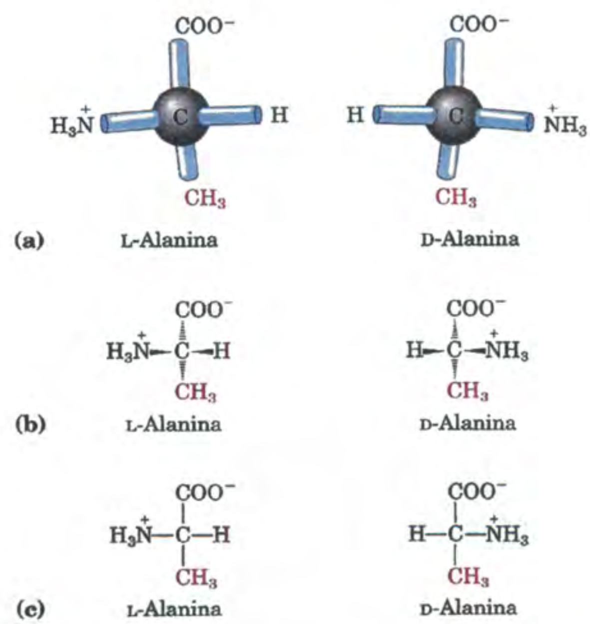


FIGURA 3–3 Estereoisomería en los α-aminoácidos. **(a)** Los dos estereoisómeros de la alanina, la L- y la D-alanina, son imágenes especulares no superponibles entre sí (enantiómeros). **(b, c)** Dos convenciones diferentes para mostrar la configuración en el espacio de los estereoisómeros. En las fórmulas de perspectiva **(b)** los enlaces con forma de cuña se proyectan fuera del plano del papel; los enlaces a trazos lo hacen por detrás. En las fórmulas de proyección **(c)** se supone que los enlaces horizontales se proyectan fuera del plano del papel, los enlaces verticales por detrás. No obstante, se utilizan a menudo las fórmulas de proyección de modo no sistemático, sin pretender representar una configuración estereoquímica específica.

TABLA 3–1 Propiedades y convenciones asociadas con los aminoácidos estándar encontrados en proteínas

Aminoácido	Abreviatura/ símbolo	M_r*	Valores de pK_a: pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH_3^+)	pK_R (grupo R)	pI	Índice hidropático†	Presencia en las proteínas (%)‡
Grupos R apolares, alifáticos								
Glicina	Gly G	75	2,34	9,60		5,97	−0,4	7,2
Alanina	Ala A	89	2,34	9,69		6,01	1,8	7,8
Prolina	Pro P	115	1,99	10,96		6,48	1,6	5,2
Valina	Val V	117	2,32	9,62		5,97	4,2	6,6
Leucina	Leu L	131	2,36	9,60		5,98	3,8	9,1
Isoleucina	Ile I	131	2,36	9,68		6,02	4,5	5,3
Metionina	Met M	149	2,28	9,21		5,74	1,9	2,3
Grupos R aromáticos								
Fenilalanina	Phe F	165	1,83	9,13		5,48	2,8	3,9
Tirosina	Tyr Y	181	2,20	9,11	10,07	5,66	−1,3	3,2
Triptófano	Trp W	204	2,38	9,39		5,89	−0,9	1,4
Grupos R polares sin carga								
Serina	Ser S	105	2,21	9,15		5,68	−0,8	6,8
Treonina	Thr T	119	2,11	9,62		5,87	−0,7	5,9
Cisteína§	Cys C	121	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5	1,9
Asparagina	Asn N	132	2,02	8,80		5,41	−3,5	4,3
Glutamina	Gln Q	146	2,17	9,13		5,65	−3,5	4,2
Grupos R cargados positivamente								
Lisina	Lys K	146	2,18	8,95	10,53	9,74	−3,9	5,9
Histidina	His H	155	1,82	9,17	6,00	7,59	−3,2	2,3
Arginina	Arg R	174	2,17	9,04	12,48	10,76	−4,5	5,1
Grupos R cargados negativamente								
Aspartato	Asp D	133	1,88	9,60	3,65	2,77	−3,5	5,3
Glutamato	Glu E	147	2,19	9,67	4,25	3,22	−3,5	6,3

*Los valores de M_r reflejan las estructuras tal y como se muestran en la Figura 3–5. Los elementos del agua (M_r 18) se restan cuando el aminoácido se incorpora a un polipéptido.

†Una escala que combina la hidrofobicidad y la hidrofilicidad de los grupos R. Los valores reflejan la energía libre (ΔG) de transferencia de la cadena lateral del aminoácido desde un disolvente hidrofóbico a agua. Esta transferencia es favorable (ΔG<0, valor negativo en el índice) para aminoácidos con cadena lateral cargada o polar, y desfavorable (ΔG>0, valor positivo en el índice) para aminoácidos con cadena lateral apolar o más hidrofóbica. Véase el Capítulo 11. Tomado de Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132.

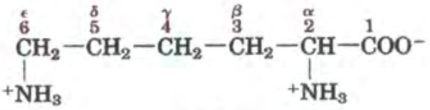
‡Presencia media en más de 1.150 proteínas. Tomado de Doolittle, R.F. (1989) Redundancies in protein sequences. En *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman, G.D., ed.), pp. 599–623, Plenum Press, New York.

§La cisteína se clasifica generalmente como polar a pesar de tener un índice de hidropatía positivo. Ello refleja la capacidad del grupo sulfhidrilo para actuar como ácido débil y para formar enlaces de hidrógeno débiles con el oxígeno o el nitrógeno.

(Fig. 3–3), las dos formas constituyen un tipo de estereoisómeros, los **enantiómeros** (véase la Fig. 1–19). Todas las moléculas con un centro quiral son **ópticamente activas**, es decir, hacen girar el plano de la luz polarizada (véase Recuadro 1–2).

CONVENCIÓN CLAVE: Se utilizan dos convenciones para identificar los carbonos dentro de un aminoácido, una práctica que puede llegar a generar confusión. Los carbonos adicionales de un grupo R se designan comúnmente β, γ, δ, ε, etc., empezando siempre a partir del carbono α. Para la mayoría de las demás moléculas orgánicas, los átomos de carbono se numeran simplemente a partir de un extremo, dando la máxima prioridad (C-1) a aquellos carbonos cuyos sustituyentes contengan átomos de mayor número atómico. Siguiendo esta última convención, el

grupo carboxilo de un aminoácido sería el C-1 y el carbono α sería el C-2, como se refleja en la molécula de lisina



Lisina

En algunos casos, como en aminoácidos con grupos R heterocíclicos como la histidina, el sistema de letras griegas es ambiguo y se utiliza por ello la convención numérica. En aminoácidos con cadena lateral ramificada, los carbonos equivalentes reciben números a continuación de las letras griegas. La leucina tiene, por tanto, carbonos $\delta 1$ y $\delta 2$ (véase la estructura en la Fig. 3-5.) ■

Para especificar la **configuración absoluta** de los cuatro sustituyentes de los átomos de carbono asimétricos se ha desarrollado una nomenclatura especial. Las configuraciones absolutas de los azúcares sencillos y los aminoácidos se especifican mediante el **sistema D, L (Fig. 3–4)**, basado en la configuración absoluta del azúcar de tres carbonos gliceraldehído, una convención propuesta por Emil Fischer en 1891. (Fischer conocía los grupos que rodean el átomo de carbono asimétrico del gliceraldehído pero tuvo que adivinar su configuración absoluta; su predicción se confirmó posteriormente por análisis de difracción de rayos X.) Para todos los compuestos quirales, los estereoisómeros que tienen una configuración relacionada con la del L-gliceraldehído se designan como L, y los estereoisómeros relacionados con el D-gliceraldehído se designan como D. Los grupos funcionales de la L-alanina se hacen coincidir con los del L-gliceraldehído alineando aquellos que pueden interconvertirse mediante reacciones químicas simples en un solo paso. Así, el grupo carboxilo de la L-alanina ocupa la misma posición respecto al carbono quiral que el grupo aldehído del L-gliceraldehído, puesto que un aldehído puede convertirse fácilmente en un grupo carboxilo en un solo paso mediante una oxidación. Históricamente, las denominaciones similares L y D se utilizaron para levorrotatorio (que gira la luz a la izquierda) y dextrorrotatorio (que gira la luz a la derecha). Sin embargo, no todos los L-aminoácidos son levorrotatorios, y se hizo necesaria la convención que se muestra en la Figura 3–4 para evitar posibles ambigüedades sobre la configuración absoluta. Según la convención de Fischer, L y D hacen referencia *solamente* a la configuración absoluta de los cuatro sustituyentes alrededor del carbono quiral.

Otro sistema para especificar la configuración alrededor de un centro quiral es el **sistema RS,** que se utiliza en la nomenclatura sistemática de la química orgánica y describe con mayor precisión la configuración de las moléculas con más de un centro quiral (véase p. 17).

Los residuos aminoácidos de las proteínas son estereoisómeros L

Casi todos los compuestos biológicos con un centro quiral se presentan en la naturaleza en una sola de sus formas estereoisómeras, sea la D o la L. Los residuos aminoácidos de las proteínas son exclusivamente L-estereoisómeros. Sólo se han encontrado D-aminoácidos en unos pocos péptidos, generalmente pequeños, que incluyen algunos péptidos presentes en las paredes celulares bacterianas así como algunos antibióticos peptídicos.

Es un hecho notable que todos los aminoácidos de las proteínas sean L-estereoisómeros. Cuando se forman compuestos quirales en reacciones químicas ordinarias, el resultado es una mezcla racémica de isómeros D y L, que son difíciles de distinguir y de aislar por el químico. Sin embargo, para los sistemas vivientes, los isómeros D y L son tan diferentes como la mano derecha y la izquierda. La formación de subestructuras estables y repetidas en las proteínas (Capítulo 4) requiere en general que los aminoácidos que las constituyen sean de una misma serie estereoquímica. Las células son capaces de sintetizar específicamente los isómeros L de los aminoácidos gracias a que los centros activos de los enzimas son asimétricos, lo que implica que las reacciones que catalizan sean estereoespecíficas.

FIGURA 3–4 Relación estérica de los estereoisómeros de la alanina con la configuración absoluta del L- y D-gliceraldehído. En estas fórmulas de perspectiva los carbonos están alineados verticalmente con el átomo quiral en el centro. Los carbonos de estas moléculas están numerados empezando con los carbonos aldehído o carboxilo (en rojo), de 1 a 3 y de arriba a abajo tal como se muestra. Cuando se presentan de esta forma, el grupo R del aminoácido (en este caso el grupo metilo de la alanina) está siempre debajo del carbono α. Los L-aminoácidos son los que tienen el grupo α-amino a la izquierda y los D-aminoácidos los que tienen el grupo α-amino a la derecha.

Los aminoácidos se pueden clasificar según su grupo R

El conocimiento de las propiedades químicas de los aminoácidos estándar es de vital importancia para la comprensión de la bioquímica. El tema se puede simplificar agrupando los aminoácidos en cinco clases principales basadas en las propiedades de sus grupos R (Tabla 3–1), en especial su **polaridad**, o tendencia a interaccionar con el agua a pH biológico (cerca de pH 7,0). La polaridad de los grupos R varía enormemente desde totalmente apolar o hidrofóbico (insoluble en agua) a altamente polar o hidrofílico (soluble en agua).

En la **Figura 3–5** se muestran las estructuras de los 20 aminoácidos estándar, y algunas de sus propiedades se muestran en la Tabla 3–1. Dentro de cada clase existen gradaciones de polaridad, tamaño y forma de los grupos R.

Grupos R apolares alifáticos Los grupos R de esta clase de aminoácidos son apolares e hidrofóbicos. Las cadenas laterales

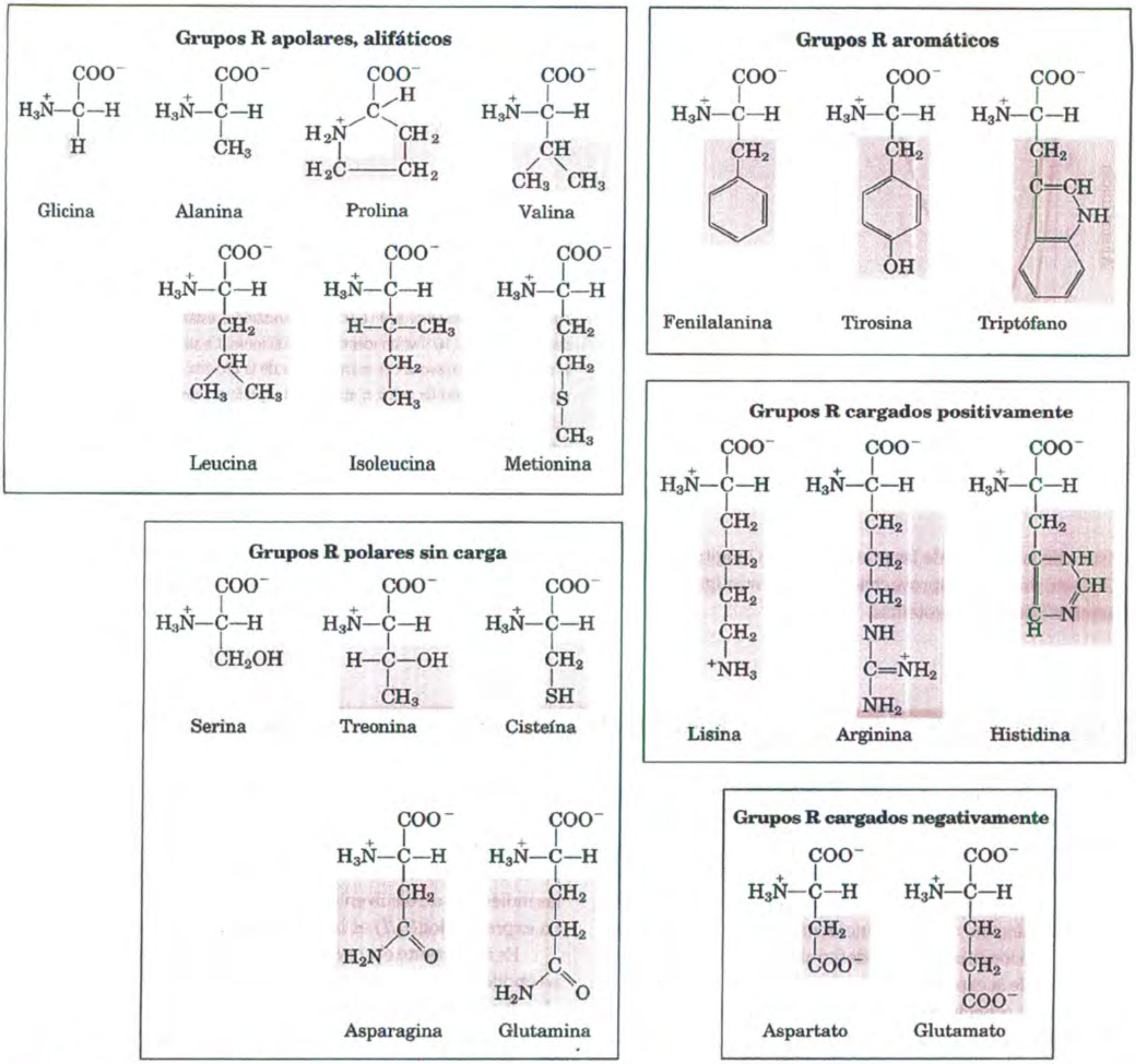


FIGURA 3–5 Los 20 aminoácidos estándar de las proteínas. Las fórmulas estructurales muestran el estado de ionización que predomina a pH 7,0. Las partes no sombreadas son comunes para todos los aminoácidos; las partes sombreadas en rojo son los grupos R. Aunque el grupo R de la histidina se muestra sin carga, su pK_a (véase la Tabla 3–1) es tal que una fracción pequeña pero significativa de estos grupos está cargada positivamente a pH 7,0. La forma protonada de la histidina se muestra en la parte superior del gráfico de la Figura 3–12b.

de la **alanina,** la **valina,** la **leucina** y la **isoleucina** tienden a agruparse entre sí en las proteínas, estabilizando las estructuras proteicas a través de interacciones hidrofóbicas. La **glicina** tiene la estructura más simple. Aunque formalmente es apolar, su muy pequeña cadena lateral no tiene una contribución real en las interacciones hidrofóbicas. La **metionina,** uno de los dos aminoácidos que contienen azufre, tiene un grupo tioéter apolar en su cadena lateral. La **prolina** tiene una cadena lateral alifática con una estructura cíclica especial. El grupo amino secundario (imino) de los residuos de prolina tiene una conformación rígida que reduce la flexibilidad estructural de las regiones polipeptídicas que contienen este aminoácido.

Grupos R aromáticos. La **fenilalanina,** la **tirosina** y el **triptófano,** con sus cadenas laterales aromáticas, son relativamente apolares (hidrofóbicos). Todos ellos pueden participar en interacciones hidrofóbicas. El grupo hidroxilo de la tirosina puede formar puentes de hidrógeno y constituye un grupo funcional importante en algunos enzimas. La tirosina y el triptófano son significativamente más polares que la fenilalanina debido al grupo hidroxilo de la tirosina y al nitrógeno del anillo indólico del triptófano.

El triptófano y la tirosina, y en mucho menor grado la fenilalanina, absorben la luz ultravioleta (**Fig. 3–6**; véase también el Recuadro 3–1). Esto explica la fuerte absorbancia de la luz ca-

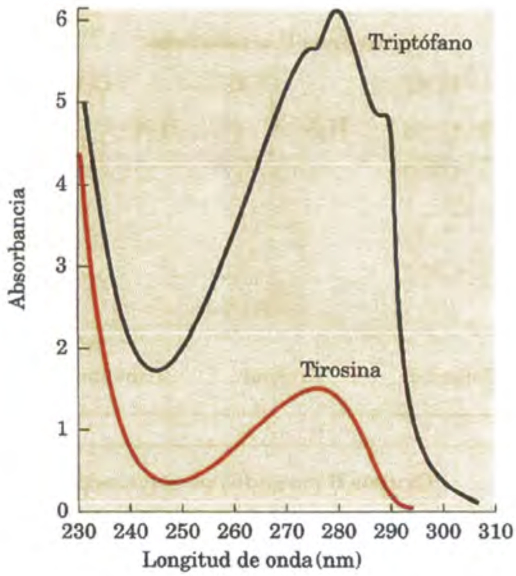


FIGURA 3–6 Absorción de la luz ultravioleta por los aminoácidos aromáticos. Comparación de los espectros de absorción de luz de los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina a pH 6,0. Los aminoácidos están presentes en cantidades equimolares (10^{-3} M) en idénticas condiciones. La absorbancia medida para el triptófano es cuatro veces mayor que la de la tirosina. Obsérvese que el máximo de absorción de la luz tanto para el triptófano como para la tirosina está cercano a una longitud de onda de 280 nm. La absorción de luz por el tercer aminoácido aromático, la fenilalanina (no mostrado), generalmente contribuye poco a las propiedades de absorbancia de las proteínas.

racterística de la mayoría de las proteínas a una longitud de onda de 280 nm, propiedad aprovechada por los investigadores en la caracterización de las proteínas.

Grupos R polares sin carga Los grupos R de estos aminoácidos son más solubles en agua, o más hidrofílicos, que los de los aminoácidos apolares, debido a que contienen grupos fun-

RECUADRO 3–1 MÉTODOS Absorción de la luz por las moléculas: ley de Lambert-Beer

Una gran variedad de biomoléculas absorben luz a longitudes de onda características, de la misma forma que el triptófano absorbe luz a 280 nm (véase la Fig. 3–6). Se utiliza la medida de la absorción de la luz mediante un espectrofotómetro para detectar e identificar moléculas y para medir su concentración en disolución. La fracción de la luz incidente absorbida por una disolución a una longitud de onda determinada está relacionada con el espesor de la capa absorbente (paso óptico) y con la concentración de la especie absorbente (Fig. 1). Estas dos relaciones se combinan en la ley de Lambert-Beer,

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

en donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, la razón I/I_0 (el inverso de la razón utilizada en la fórmula) es la transmitancia, ε es el coeficiente de absorción molar (en unidades de litros por mol-centímetro), c es la concentración de la especie absorbente (en moles por litro) y l el paso óptico de la muestra que absorbe la luz (en centímetros). La ley de Lambert-Beer supone que la luz incidente es paralela y monocromática (de una sola longitud de onda) y que las moléculas de disolvente y de soluto están orientadas al azar. La expresión $\log(I_0/I)$ es la **absorbancia** y se designa por A.

Es importante observar que cada milímetro sucesivo de paso óptico de la solución absorbente en una cubeta de 1,0 cm no absorbe una cantidad constante sino una fracción constante de la luz que incide en él. No obstante, con una capa absorbente de camino óptico fijo, *la absorbancia A es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente.*

El coeficiente de absorción molar varía con la naturaleza del compuesto absorbente, el disolvente, la longitud de onda, y también con el pH si la especie absorbente de luz está en equilibrio con un estado de ionización que tiene diferentes propiedades de absorbancia.

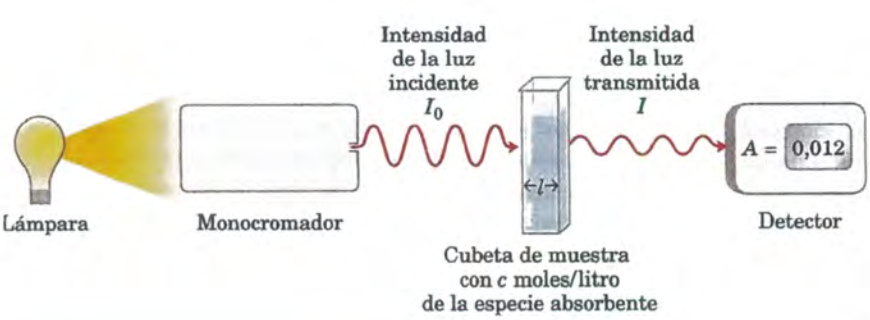


FIGURA 1 Componentes principales de un espectrofotómetro. Una fuente de luz emite en un amplio espectro. A continuación, el monocromador selecciona y transmite luz de una longitud de onda determinada. La luz del monocromador pasa a través de la muestra situada en una cubeta de paso óptico l y es absorbida por la muestra en proporción a la concentración de la especie absorbente. La luz transmitida se mide mediante un detector.

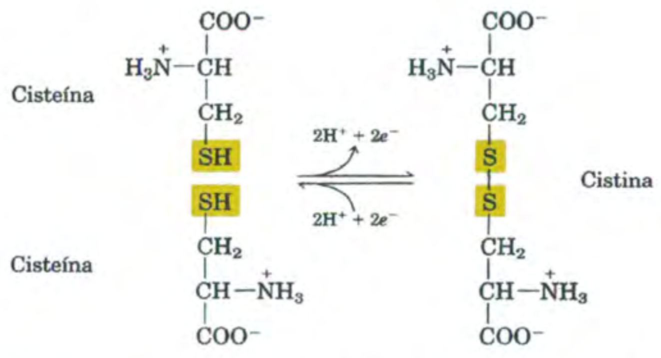


FIGURA 3–7 Formación reversible de un puente disulfuro por oxidación de dos moléculas de cisteína. Los puentes disulfuro entre residuos de Cys estabilizan las estructuras de muchas proteínas.

cionales que forman puentes de hidrógeno con el agua. En esta clase de aminoácidos se incluyen la **serina,** la **treonina,** la **cisteína,** la **asparagina** y la **glutamina.** La polaridad de la serina y treonina proviene de sus grupos hidroxilo; en el caso de la cisteína de su grupo sulfhidrilo, que es un ácido débil y puede establecer enlaces de hidrógeno débiles con el oxígeno o el nitrógeno; y en el de la asparagina y de la glutamina de sus grupos amido.

La asparagina y la glutamina son las amidas de otros dos aminoácidos que también se encuentran en las proteínas, el aspartato y el glutamato, respectivamente, a los que se hidrolizan fácilmente por ácido o base.

La cisteína se oxida con suma facilidad formando un aminoácido dimérico unido covalentemente llamado **cistina,** en el que dos moléculas de cisteína están unidas a través de un enlace disulfuro **(Fig. 3–7)**. Los residuos unidos por un enlace disulfuro son fuertemente hidrofóbicos (apolares). Los enlaces disulfuro desempeñan un papel especial en la estructura de muchas proteínas puesto que forman uniones covalentes entre partes de una molécula de proteína o entre dos cadenas proteicas diferentes.

Grupos R cargados positivamente (básicos) Los grupos R más hidrofílicos son aquellos que están cargados, sea positiva o negativamente. Los aminoácidos en los que los grupos R tienen una carga neta positiva a pH 7,0 son la **lisina,** que tiene un grupo amino primario adicional en la posición *E* de su cadena alifática; la **arginina,** que tiene un grupo guanidinio cargado positivamente, y la **histidina,** que contiene un grupo imidazol. Al ser el único aminoácido común que posee una cadena lateral ionizable con un pK_a próximo a la neutralidad, la histidina tanto puede estar cargada positivamente (forma protonada) como no tener carga a pH 7,0. Los residuos de His facilitan muchas reacciones catalizados por enzimas al servir de dadores/aceptores de protones.

Grupos R cargados negativamente (ácidos) Los dos aminoácidos que tienen grupos R con una carga neta negativa a pH 7,0 son el **aspartato** y **glutamato,** cada uno de los cuales tiene un segundo grupo carboxilo.

Los aminoácidos no estándar tienen también importantes funciones

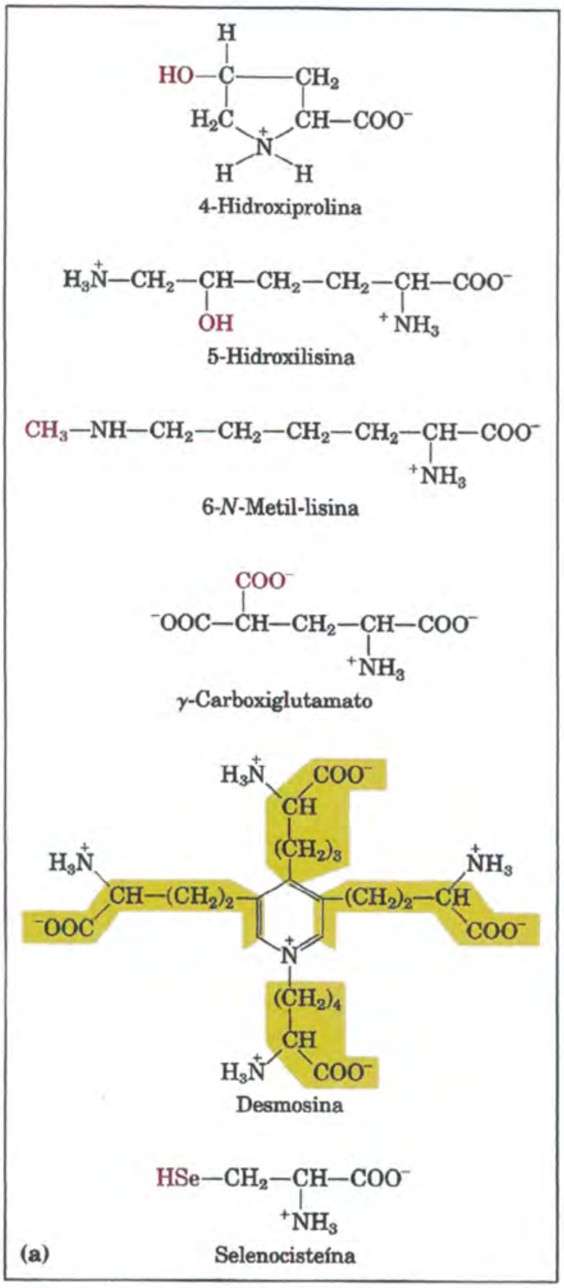
Además de los 20 aminoácidos estándar, las proteínas pueden contener residuos creados por modificación de los residuos estándar ya incorporados a un polipéptido **(Fig. 3–8a)**. Entre los aminoácidos no estándar están la **4-hidroxiprolina,** que es un derivado de la prolina y la **5-hidroxilisina,** derivada de la lisina. La primera se encuentra en la pared celular de plantas y ambas se encuentran en el colágeno, una proteína fibrosa del tejido conjuntivo.

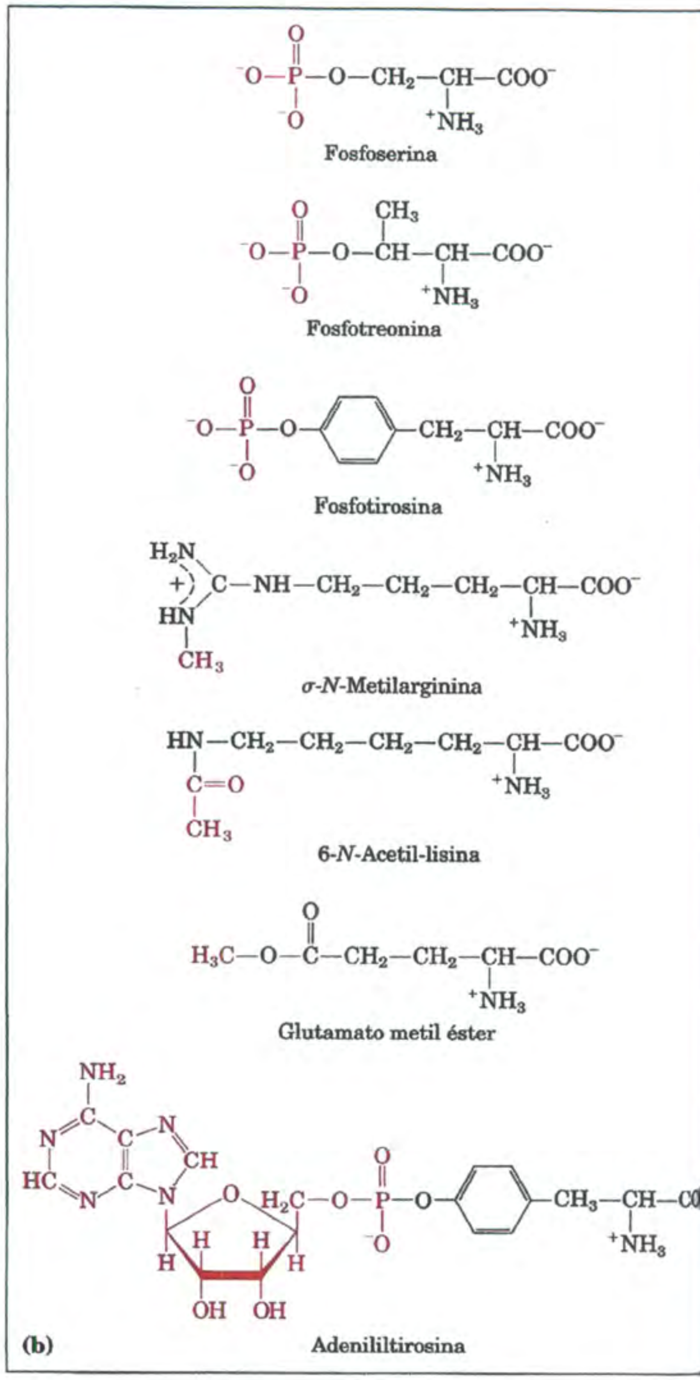
La **6-*N*-metil-lisina** es un constituyente de la miosina, una proteína contráctil del músculo. Otro aminoácido no estándar importante es el **γ-carboxiglutamato,** que se encuentra en la proteína protrombina que interviene en la coagulación de la sangre, así como en ciertas otras proteínas que unen Ca^{2+} como parte de su función biológica. Más compleja es la **desmosina,** que es un derivado de cuatro residuos diferentes de Lys y que se encuentra en la proteína fibrosa elastina.

La **selenocisteína** es un caso especial. Este poco frecuente residuo es introducido durante la síntesis de proteínas en lugar de ser creado a través de una modificación postsintética. Contiene selenio en lugar del azufre de la cisteína. La selenocisteína, que de hecho proviene de la serina, se encuentra sólo en unas pocas proteínas conocidas.

Algunos de los residuos aminoácidos de una proteína pueden ser modificados de forma transitoria para alterar la función de la proteína. La adición de grupos fosforilo, metilo, acetilo, adenililo, ADP-ribosilo u otros a residuos aminoácidos específicos puede aumentar o disminuir la actividad de la proteína (Fig. 3–8b). La fosforilación es una modificación reguladora muy común. La estrategia reguladora consistente en la modificación covalente de proteínas se discute con más detalle más adelante, en el Capítulo 6.

Se han encontrado alrededor de otros 300 aminoácidos en las células. Tienen funciones diversas pero no todos forman parte de proteínas. La **ornitina** y la **citrulina** (Fig. 3–8c) merecen mención especial porque son intermediarios clave (metabolitos) en la biosíntesis de la arginina (Capítulo 22) y en el ciclo de la urea (Capítulo 18).





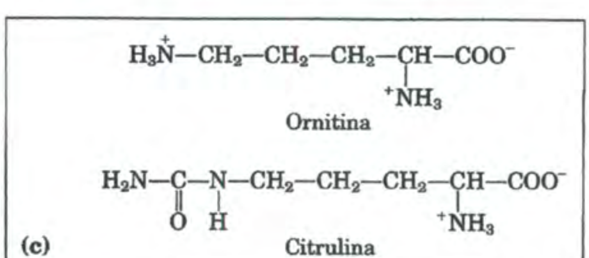


FIGURA 3–8 Aminoácidos no estándar. (a) Algunos aminoácidos no estándar encontrados en proteínas. Todos ellos provienen de aminoácidos estándar. Los grupos funcionales extra añadidos a través de reacciones de modificación se muestran en rojo. La desmosina se forma a partir de cuatro residuos de Lys (los cuatro esqueletos carbonados están sombreados en amarillo). Observe el uso alternativo de números o de letras griegas para identificar los átomos de carbono de esta estas estructuras. **(b)** Modificaciones reversibles de aminoácidos implicadas en la regulación de la actividad de proteínas. La fosforilación es la modificación covalente reguladora más frecuente. **(c)** La ornitina y la citrulina, que no se encuentran en proteínas, son intermediarios en la biosíntesis de arginina y en el ciclo de la urea.

Los aminoácidos pueden actuar como ácidos y como bases

Los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos, junto con los grupos R ionizables de algunos aminoácidos, actúan como ácidos y bases débiles. Cuando un aminoácido sin grupo R ionizable se disuelve en agua a pH neutro, se encuentra en solución en forma de ión dipolar, o **zwitterion** (el alemán para "ión híbrido"), que puede actuar como ácido o como base **(Fig. 3–9)**. Las sustancias con esta naturaleza dual (ácido-base) son **anfóte-**

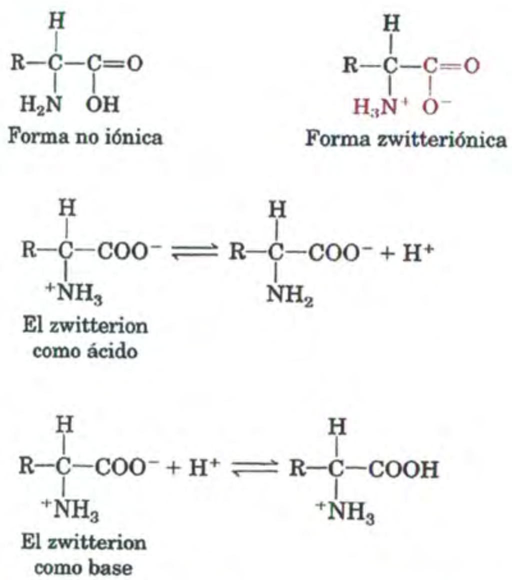


FIGURA 3–9 Formas no iónica y zwitteriónica de los aminoácidos. La forma no iónica no se encuentra en cantidades significativas en disoluciones acuosas. El zwitterion predomina a pH neutro. Un zwitterion puede actuar como ácido (donador de protones) o como base (aceptor de protones).

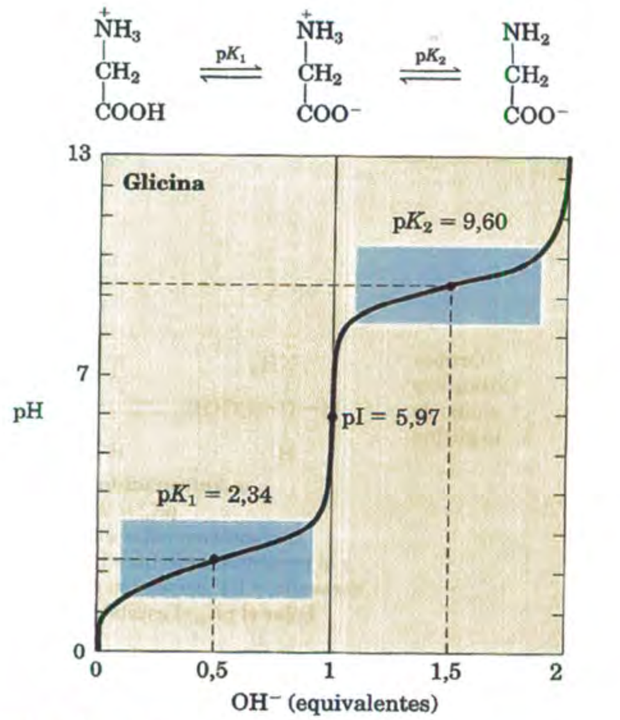
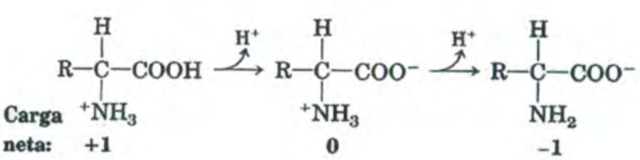


FIGURA 3–10 Titulación de un aminoácido. Se muestra aquí la curva de titulación de glicina 0,1 M a 25 °C. Las especies iónicas predominantes en puntos clave de la titulación se muestran encima de la gráfica. Los recuadros sombreados, centrados alrededor de $pK_1 = 2{,}34$ y $pK_2 = 9{,}60$, indican las regiones de máximo poder tamponante. Observe que 1 equivalente de $OH^- = 0{,}1$ M NaOH añadido.

ras y a menudo se denominan **anfolitos** (de "electrolitos anfóteros"). Un α-aminoácido sencillo monoamínico y monocarboxílico, tal como la alanina, es un ácido diprótico cuando está totalmente protonado; tiene dos grupos, el grupo —COOH y el grupo $—NH_3^+$, que pueden liberar protones:



Los aminoácidos tienen curvas de titulación características

La titulación ácido-base implica la adición o eliminación gradual de protones (Capítulo 2). La **Figura 3–10** muestra la curva de titulación de la forma diprótica de la glicina. Los dos grupos ionizables de la glicina, el grupo carboxílico y el grupo amino, se titulan con una base fuerte tal como el NaOH. La gráfica tiene dos etapas distintas, que corresponden a la desprotonación de dos grupos diferentes de la glicina. Cada una de las etapas se asemeja en su forma a la curva de titulación de un ácido monoprótico tal como el ácido acético (véase la Fig. 2–16), y puede analizarse de la misma manera. A pH muy bajo, la especie iónica predominante de la glicina es $^+H_3N—CH_2—COOH$, la forma totalmente protonada. En el punto medio de la primera etapa de la titulación, en el que el grupo —COOH de la glicina pierde su protón, se encuentran presentes concentraciones equimolares del dador de protones ($^+H_3N—CH_2—COOH$) y del aceptor de protones ($^+H_3N—CH_2—COO^-$). En el punto medio de cualquier titulación se alcanza un punto de inflexión en que el pH es igual al pK_a del grupo protonado que se está titulando (véase la Fig. 2–17). Para la glicina el pH en el punto medio es 2,34 y por lo tanto su grupo —COOH tiene un pK_a (rotulado como pK_1 en la Fig. 3–10) de 2,34. (Recuérdese del Capítulo 2 que pH y pK_a son simplemente notaciones útiles de la concentración de protones y de la constante de equilibrio de la ionización, respectivamente. El pK_a es una medida de la tendencia de un grupo a ceder un protón, tendencia que disminuye en un factor de 10 cada vez que el pK_a se incrementa en una unidad.) A medida que avanza la titulación se alcanza otro punto importante a pH 5,97. Aquí hay otro punto de inflexión en el que la eliminación del primer protón es prácticamente completa mientras que tan sólo se ha iniciado la eliminación del segundo. A este pH la glicina se encuentra mayoritariamente en forma del ión dipolar (zwitterion) $^+H_3N—CH_2—COO^-$. Pronto volveremos sobre el significado de este punto de inflexión en la curva de titulación (pI en la Fig. 3–10).

La segunda etapa de la titulación corresponde a la eliminación de un protón del grupo $—NH_3^+$ de la glicina. El pH en el punto medio de esta etapa es 9,60, igual al pK_a (rotulado pK_2 en la Fig. 3–10) del grupo $—NH_3^+$. La titulación es prácticamente completa a un pH alrededor de 12, en donde la forma predominante de la glicina es $H_2N—CH_2—COO^-$.

A partir de la curva de titulación de la glicina se pueden deducir diversas informaciones interesantes. En primer lugar, da una medida cuantitativa del pK_a de cada uno de los grupos ionizables: 2,34 para el —COOH y 9,60 para el grupo $—NH_3^+$. Obsérvese que el grupo carboxilo de la glicina es más de 100 veces más ácido (se ioniza más fácilmente) que el grupo carboxilo del ácido acético, que, como vimos en el Capítulo 2, tie-

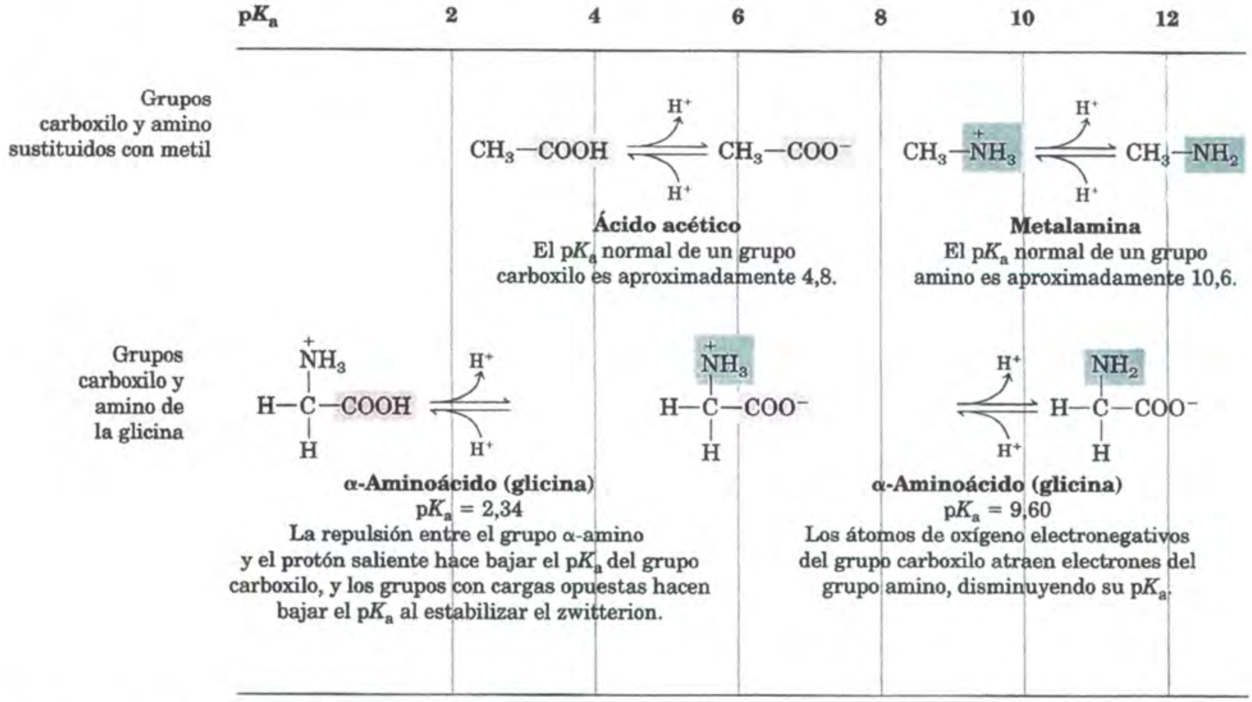


FIGURA 3–11 Efecto del entorno químico en el pK_a. Los valores de pK_a para los grupos ionizables de la glicina son menores que los de los grupos amino y carboxilo sustituidos simplemente por un metilo. Estas perturbaciones que hacen bajar el pK_a son debidas a interacciones intramoleculares. Efectos similares pueden ser causados por grupos químicos que están posicionados en las cercanías de un grupo ionizable, por ejemplo, en el centro activo de un enzima.

ne un pK_a de 4,76, cercano al promedio para un grupo carboxílico unido a un hidrocarburo alifático sin más sustituyentes. La perturbación del pK_a de la glicina está causada por la repulsión entre el protón saliente y el grupo amino cargado positivamente cercano situado en el átomo de carbono α, tal como se describe en la **Figura 3–11**. Las cargas opuestas en el zwitterion resultante tienen un efecto estabilizante. De modo similar, el pK_a del grupo amino de la glicina es menor que el pK_a medio de un grupo amino. Este efecto es debido en parte a los átomos de oxígeno electronegativos del grupo carboxilo, que tienden a atraer electrones hacia ellos, aumentando así la tendencia del grupo amino a ceder un protón. Por tanto, el grupo *α*-amino tiene un pK_a menor que el de una amina alifática tal como la metilamina (Fig. 3–11). En resumen, el pK_a de cualquier grupo funcional está fuertemente afectado por su entorno químico, un fenómeno que a veces es utilizado en los centros activos de los enzimas para promover mecanismos de reacción exquisitamente adaptados que dependen de los valores modificados de los pK_a de grupos dadores/aceptores de protones de residuos específicos.

La segunda información que proporciona la curva de titulación de la glicina es que este aminoácido tiene *dos* regiones de capacidad tamponante. Una de éstas es la porción relativamente plana de la curva que abarca alrededor de una unidad de pH a cada lado del primer pK_a de 2,34, lo que indica que la glicina es un buen tampón cerca de este pH. La otra zona de tamponamiento está centrada alrededor de pH 9,60. (Obsérvese que la glicina no es un buen tampón al pH del fluido intracelular o de la sangre, que es de alrededor de 7,4.) Dentro de los márgenes de tamponamiento de la glicina, se puede utilizar la ecuación de Henderson-Hasselbalch (p. 60) para calcular las proporciones de especies dadora y aceptora de protones de la glicina que se requieren para preparar un tampón a un pH determinado.

La curva de titulación predice la carga eléctrica de los aminoácidos

Otra información importante deducida de la curva de titulación de un aminoácido es la relación entre su carga eléctrica neta y el pH de la disolución. A pH 5,97, punto de inflexión entre las dos etapas de su curva de titulación, la glicina está presente de manera predominante en su forma dipolar, totalmente ionizada pero sin carga eléctrica *neta* (Fig. 3–10). El pH característico en que la carga eléctrica neta es cero se denomina **punto isoeléctrico** o **pH isoeléctrico,** designado **pI**. En el caso de la glicina, que no tiene grupo ionizable en su cadena lateral, el punto isoeléctrico es simplemente la media aritmética de los dos valores de pK_a:

$$\text{pI} = \frac{1}{2}(\text{p}K_1 + \text{p}K_2) = \frac{1}{2}(2{,}34 + 9{,}60) = 5{,}97$$

Como resulta evidente de la Figura 3–10, la glicina tiene una carga neta negativa a cualquier pH por encima de su pI, por lo que se desplazará hacia el electrodo positivo (ánodo) cuando se coloque en un campo eléctrico. A cualquier pH por debajo de su pI, la glicina tiene una carga neta positiva, y se desplazará hacia el electrodo negativo (cátodo). Cuanto más alejado esté el pH de una disolución de glicina de su punto isoeléctrico, mayor será la carga eléctrica neta de la población de moléculas de glicina. Por ejemplo, a pH 1,0 la glicina se encuentra enteramente en su forma $^+H_3N—CH_2—COOH$ con una carga positiva neta de 1,0. A pH 2,34, en el que hay una mezcla pari-

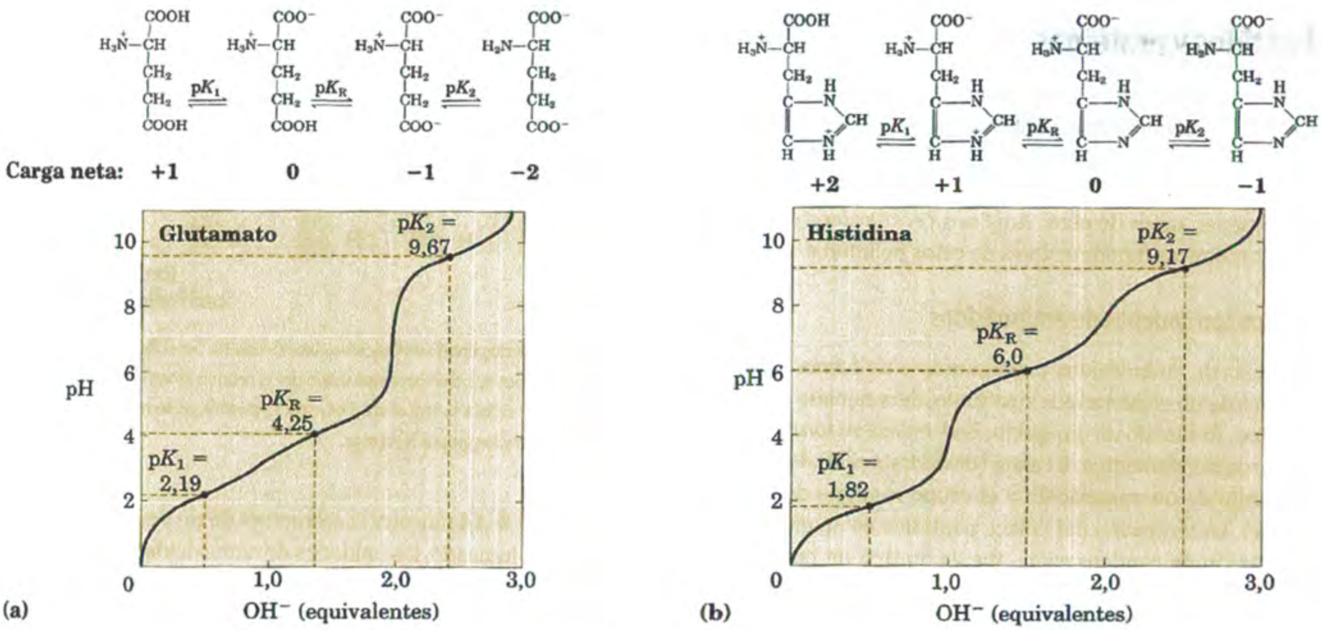


FIGURA 3–12 Curvas de titulación de **(a)** glutamato y **(b)** histidina. El pK_a del grupo R se designa pK_R.

taria de $^{+}H_3N—CH_2—COOH$ y $^{+}H_3N—CH_2—COO^{-}$, la carga positiva neta o promedio es de 0,5. De la misma manera se puede predecir el signo y la magnitud de la carga neta de cualquier aminoácido a cualquier pH.

Los aminoácidos difieren en sus propiedades ácido-base

Las propiedades compartidas por muchos aminoácidos permiten algunas simplificaciones generales acerca de su comportamiento ácido-base. En primer lugar, todos los aminoácidos con un solo grupo α-amino, un solo grupo α-carboxilo y un grupo R no ionizable tienen curvas de titulación parecidas a la de la glicina (Fig. 3–10). Estos aminoácidos tienen valores de pK_a muy similares, aunque no idénticos: el pK_a de los grupos —COOH está en el intervalo de 1,8 a 2,4 y el pK_a de los grupos $—NH_3^+$ en el intervalo de 8,8 a 11,0 (Tabla 3–1). Las diferencias en los valores de pK_a reflejan los efectos de los grupos R. En segundo lugar, los aminoácidos con un grupo R ionizable tienen curvas de titulación más complejas, con *tres* etapas correspondientes a los tres pasos de ionización posibles; tienen, por tanto, tres valores de pK_a. La etapa adicional debida a la titulación del grupo R ionizable se fusiona en cierto grado con las otras dos. En la **Figura 3–12** se muestran las curvas de titulación de dos aminoácidos de este tipo, glutamato e histidina. Los puntos isoeléctricos reflejan la naturaleza de los grupos R ionizables presentes. Así por ejemplo, el glutamato tiene un pI de 3,22, considerablemente inferior al de la glicina. Esto es el resultado de la presencia de dos grupos carboxilo que, en el promedio de sus valores de pK_a (3,22), contribuyen con una carga negativa neta de −1 que equilibra la de +1 debida al grupo amino. De modo semejante, el pI de la histidina, con dos grupos cargados positivamente cuando están protonados, es de 7,59 (el promedio de los valores de pK_a de los grupos amino e imidazol), mucho mayor que el de la glicina.

Finalmente, tal y como se ha indicado anteriormente, en las condiciones generales de exposición libre y abierta al entorno acuoso, sólo la histidina tiene un grupo R (pK_a = 6,0) que proporciona un poder tamponante significativo al pH cercano a la neutralidad presente normalmente en los fluidos inter e intracelulares de la inmensa mayoría de animales y bacterias (Tabla 3–1).

RESUMEN 3.1 Aminoácidos

- Los 20 aminoácidos que se encuentran normalmente como residuos en las proteínas contienen un grupo α-carboxilo, un grupo α-amino y un grupo R característico unido al carbono α. El átomo de carbono α de todos los aminoácidos excepto la glicina es asimétrico, por lo que los aminoácidos pueden existir en al menos dos formas estereoisoméricas. En proteínas sólo se encuentran los estereoisómeros, cuya configuración está relacionada con la de la molécula de referencia, L-gliceraldehído.
- También existen otros aminoácidos menos comunes, ya sea como constituyentes de las proteínas (mediante la modificación de los aminoácidos estándar después de la síntesis de proteínas) o como metabolitos libres.
- Los aminoácidos se clasifican en cinco tipos en base a la polaridad y carga de sus grupos R (a pH 7).
- Los aminoácidos se diferencian en sus propiedades ácido-base y tienen curvas de titulación características. Los aminoácidos monoamino-monocarboxílicos (con grupos R no ionizables) son ácidos dipróticos ($^{+}H_3NCH(R)COOH$) a pH bajo y existen en diversas formas diferentes al ir aumentando el pH. Los aminoácidos con grupos R ionizables poseen especies iónicas adicionales, que dependen del pH del medio y del pK_a del grupo R.

3.2 Péptidos y proteínas

Ahora nos ocuparemos de los polímeros de los aminoácidos, los **péptidos** y las **proteínas.** Los péptidos que se encuentran en la naturaleza varían en tamaño desde pequeñas moléculas que contienen dos o tres aminoácidos a moléculas muy grandes que contienen miles de ellos. Aquí nos centraremos en las propiedades químicas fundamentales de estos polímeros.

Los péptidos son cadenas de aminoácidos

Dos moléculas de aminoácidos pueden unirse de forma covalente a través de un enlace amida sustituido, denominado **enlace peptídico,** formando un dipéptido. Este enlace se forma por eliminación de los elementos del agua (deshidratación) del grupo α-carboxilo de un aminoácido y el grupo α-amino de otro **(Fig. 3–13)**. La formación del enlace peptídico es un ejemplo de una reacción de condensación, que es un tipo de reacción frecuente en las células vivas. En condiciones bioquímicas normales, el equilibrio de la reacción que se muestra en la Figura 3–13 favorece a los aminoácidos por encima del dipéptido. Para conseguir que la reacción sea termodinámicamente más favorable, es necesario modificar o activar químicamente el grupo carboxilo de modo que su grupo hidroxilo pueda ser eliminado más fácilmente. Al final de este capítulo se esquematiza una aproximación química a este problema. La aproximación biológica a la formación del enlace peptídico es un tema principal del Capítulo 27.

Es posible unir tres aminoácidos mediante dos enlaces peptídicos para formar un tripéptido; de manera similar se pueden unir cuatro aminoácidos para dar tetrapéptidos, cinco para formar pentapéptidos y así sucesivamente. Cuando se unen unos pocos aminoácidos de este modo, la estructura resultante se denomina **oligopéptido.** Cuando se unen muchos aminoácidos el producto se denomina **polipéptido.** Las proteínas pueden tener miles de residuos aminoácidos. Aunque a veces los términos "polipéptido" y "proteína" son intercambiables, las moléculas denominadas polipéptidos tienen generalmente masas moleculares inferiores a 10.000 y las que se denominan proteínas tienen masas moleculares superiores.

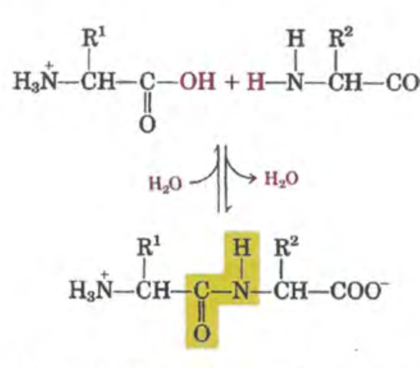


FIGURA 3–13 Formación de un enlace peptídico por condensación. El grupo α-amino de un aminoácido (con el grupo R^2) actúa como nucleófilo desplazando el grupo hidroxilo de otro aminoácido (con el grupo R^1), para formar un enlace peptídico (sombreado en amarillo). Los grupos amino son buenos nucleófilos, pero el grupo hidroxilo es un mal grupo saliente por lo que no es desplazado fácilmente. A pH fisiológico, la reacción, que aquí se muestra no tiene lugar de forma apreciable.

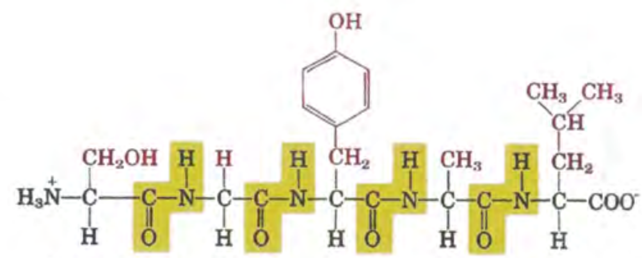


FIGURA 3–14 El pentapéptido serilglicitirosilalanil-leucina, Ser–Gly–Tyr–Ala–Leu o SGYAL. Los péptidos se nombran empezando por el residuo amino-terminal que, por convención, se sitúa a la izquierda. Los enlaces peptídicos se muestran sombreados en amarillo y los grupos R en rojo.

La **Figura 3–14** muestra la estructura de un pentapéptido. Como ya se ha indicado, las unidades de aminoácido de un péptido se denominan frecuentemente residuos (la parte que queda tras perder un átomo de hidrógeno de su grupo amino y una porción hidroxilo de su grupo carboxilo). El residuo aminoácido del extremo de un péptido que tiene un grupo α -amino libre es el residuo **amino-terminal** (o *N*-terminal); el residuo del otro extremo, que tiene un grupo carboxilo libre, es el residuo **carboxilo-terminal** (*C*-terminal).

CONVENCIÓN CLAVE: Cuando se escribe la secuencia de un péptido, polipéptido o proteína, el extremo amino se coloca a la izquierda y el extremo carboxilo a la derecha. La secuencia se lee de izquierda a derecha empezando por el residuo amino-terminal. ■

Aunque la hidrólisis de un enlace peptídico es una reacción exergónica, tiene lugar lentamente debido a su alta energía de activación (véase la p. 25). En consecuencia, los enlaces peptídicos de las proteínas son bastante estables, con una vida media ($t_{1/2}$) de alrededor de 7 años en la mayoría de condiciones intracelulares.

Los péptidos pueden distinguirse por su comportamiento de ionización

Los péptidos contienen sólo un grupo α-amino y un grupo α-carboxilo libres, uno en cada extremo **(Fig. 3–15)**. Estos grupos se ionizan de la misma manera que lo hacen en los aminoácidos libres, aunque las constantes de ionización son diferentes debido a que el grupo con carga opuesta está ausente del carbono α. Los grupos α-amino y α-carboxilo de todos los aminoácidos no terminales están unidos covalentemente en forma de enlaces peptídicos, que no se ionizan y, por tanto, no contribuyen al comportamiento total ácido-base de los péptidos. No obstante, los grupos R de algunos aminoácidos pueden ionizarse (Tabla 3–1), y contribuyen en un péptido a las propiedades ácido-base globales de la molécula (Fig. 3–15). Por tanto, puede predecirse el comportamiento ácido-base de un péptido a partir de sus grupos α-amino y α-carboxilo libres y de la naturaleza y número de sus grupos R ionizables.

Al igual que los aminoácidos libres, los péptidos tienen curvas de titulación características y pH isoeléctricos (pI) característicos a los que no se desplazan en un campo eléctrico. Estas propiedades se aprovechan en algunas de las técnicas utilizadas

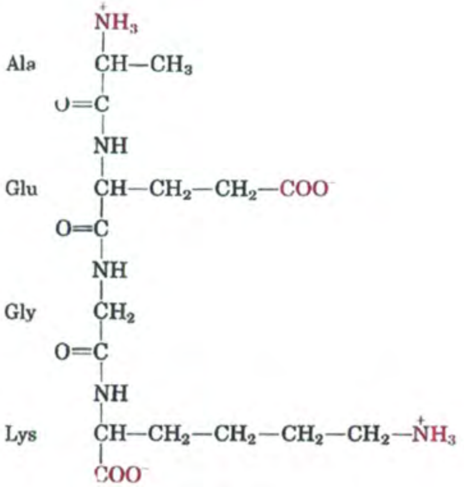
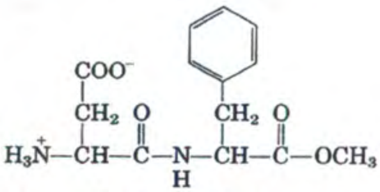


FIGURA 3–15 Alanilglutamilglicil-lisina. Este tetrapéptido tiene un grupo α-amino libre, un grupo α-carboxilo libre y dos grupos R ionizables. Los grupos ionizados a pH 7,0 se muestran en rojo.

para separar péptidos y proteínas, tal como veremos en este capítulo. Debe remarcarse que el valor del pK_a de un grupo R ionizable puede cambiar ligeramente cuando un aminoácido se convierte en un residuo de un péptido. La pérdida de carga en los grupos α-carboxilo y α-amino, las interacciones con otros grupos R del péptido y otras condiciones del entorno pueden afectar al pK_a. Los valores de pK_a para los grupos R que se muestran en la Tabla 3–1 pueden ser una guía útil para deducir el intervalo de pH en que se ionizará un determinado grupo, pero no pueden aplicarse a los péptidos de modo estricto.

Existen péptidos y polipéptidos biológicamente activos de una gran variedad de tamaños y composición

No puede hacerse ninguna generalización acerca de las masas moleculares de los péptidos y proteínas biológicamente activos en relación con su función. La longitud de los péptidos naturales varía entre dos aminoácidos y muchos miles de residuos. Incluso los péptidos más pequeños pueden tener efectos biológicamente importantes. Considérese por ejemplo el dipéptido sintético comercial L-aspartil-L-fenilalanina metil éster, un edulcorante artificial más conocido como aspartame o NutraSweet.



L-Aspartil-L-fenilalanina metil éster (aspartame)

Muchos péptidos pequeños tienen efecto a concentraciones muy bajas. Por ejemplo, diversas hormonas de vertebrados (Capítulo 23) son péptidos pequeños. Entre éstas se incluye la oxitocina (nueve residuos aminoácidos), que es secretada por la hipófisis posterior y estimula las contracciones uterinas, y el factor liberador de la tirotropina (tres residuos), que se forma en el hipotálamo y estimula la liberación de otra hormona, la tirotropina, de la hipófisis anterior. Algunos venenos de setas extremadamente tóxicos, tales como la amanitina, son también péptidos pequeños, lo mismo que muchos antibióticos.

¿Qué longitud tienen las cadenas polipeptídicas de las proteínas? Tal y como muestra la Tabla 3–2, la longitud varía considerablemente. El citocromo *c* humano tiene 104 residuos aminoácidos unidos en una única cadena; el quimotripsinógeno bovino tiene 245 residuos. En el extremo se encuentra la titina, constituyente del músculo de los vertebrados, que tiene cerca de 27.000 residuos aminoácidos y una masa molecular de alrededor de 3.000.000. La inmensa mayoría de los polipéptidos naturales son mucho más pequeños y contienen menos de 2.000 residuos aminoácidos.

TABLA 3–2 Datos moleculares de algunas proteínas

	Masa molecular	Número de residuos	Número de cadenas polipeptídicas
Citocromo *c* (humano)	12.400	104	1
Ribonucleasa A (páncreas bovino)	13.700	124	1
Lisozima (clara de huevo de gallina)	14.300	129	1
Mioglobina (corazón de caballo)	16.700	153	1
Quimotripsina (páncreas bovino)	25.200	241	3
Quimotripsinógeno (bovino)	25.700	245	1
Hemoglobina (humana)	64.500	574	4
Albúmina sérica (humana)	66.000	609	1
Hexoquinasa (levadura)	107.900	972	2
RNA polimerasa (*E. coli*)	450.000	4.158	5
Apolipoproteína B (humana)	513.000	4.536	1
Glutamina sintetasa (*E. coli*)	619.000	5.628	12
Titina (humana)	2.993.000	26.926	1

TABLA 3–3 Composición de aminoácidos de dos proteínas

	Número de residuos por molécula de proteína*	
Aminoácido	**Citocromo *c* bovino**	**Quimotripsinógeno bovino**
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	14
Asp	3	9
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Total	104	245

* En algún tipo de análisis, como en la hidrólisis ácida, Asp y Asn no se distinguen entre sí y se designan conjuntamente Asx (o B). De manera similar, cuando no es posible distinguir Glu y Gln se designan conjuntamente Glx (o Z). Además, el Trp es destruido durante la hidrólisis ácida. Deben emplearse procedimientos adicionales para determinar correctamente el contenido total en aminoácidos.

Algunas proteínas consisten en una sola cadena peptídica, pero otras, denominadas proteínas con **subunidades múltiples,** tienen dos o más polipéptidos asociados de forma no covalente (Tabla 3–2). Las cadenas polipeptídicas individuales en una proteína con diversas subunidades pueden ser idénticas o diferentes. Si como mínimo dos son idénticas, la proteína se denomina **oligomérica,** y las subunidades idénticas (constituidas por una o más cadenas polipeptídicas) se denominan **protómeros.** La hemoglobina, por ejemplo, tiene cuatro subunidades polipeptídicas: dos cadenas α idénticas y dos cadenas β idénticas, unidas todas ellas entre sí por interacciones no covalentes. Cada subunidad α está unida de forma idéntica con una subunidad β dentro de la estructura de esta proteína con subunidades múltiples, de forma que la hemoglobina puede considerarse bien como un tetrámero de cuatro subunidades polipeptídicas o un dímero de protómeros $\alpha\beta$.

Unas pocas proteínas contienen una o más cadenas polipeptídicas unidas covalentemente. Por ejemplo, las dos cadenas polipeptídicas de la insulina están unidas entre sí a través de puentes disulfuro. En estos casos, los polipéptidos individuales no se consideran subunidades, sino que se suelen denominar simplemente cadenas.

La composición de aminoácidos de las proteínas es también altamente variable. En una proteína casi nunca se encuentra la misma cantidad de los 20 aminoácidos. Algunos se dan sólo una, o ninguna, vez en un tipo determinado de proteína mientras que otros se dan numerosas veces. La Tabla 3–3 muestra la composición aminoacídica del citocromo *c* bovino y del quimotripsinógeno, el precursor inactivo del enzima digestivo quimotripsina. Estas dos proteínas, con funciones muy diferentes, también difieren significativamente en las cantidades relativas de cada tipo de residuo aminoácido.

Se puede calcular el número aproximado de residuos aminoácidos de una proteína sencilla que no contenga ningún otro grupo químico, dividiendo su masa molecular por 110. Aunque la masa molecular media de los 20 aminoácidos estándar es alrededor de 138, en la mayoría de proteínas predominan los aminoácidos más pequeños.

Si se tienen en cuenta las proporciones en que se presentan los distintos aminoácidos en las proteínas (Tabla 3–1; los promedios se determinan analizando miles de proteínas diferentes), la masa molecular media de los aminoácidos de las proteínas está próxima a 128. Dado que se elimina una molécula de agua (M_r 18) para crear cada enlace peptídico, la masa molecular media de un residuo aminoácido en una proteína está alrededor de $128 - 18 = 110$.

Algunas proteínas contienen grupos químicos diferentes a los aminoácidos

Muchas proteínas, por ejemplo los enzimas ribonucleasa A y quimotripsina, contienen sólo aminoácidos y ningún otro grupo químico adicional; a este tipo de proteínas se las considera proteínas simples. Sin embargo, algunas proteínas contienen componentes químicos diferentes a los aminoácidos asociados permanentemente; estas proteínas se denominan **proteínas conjugadas.** La parte no aminoácida de una proteína conjugada se denomina usualmente **grupo prostético.** Las proteínas conjugadas se clasifican según la naturaleza química de su grupo prostético (Tabla 3–4); por ejemplo, las **lipoproteínas** contienen lípidos, las **glucoproteínas** contienen grupos glucídicos, y las **metaloproteínas** contienen un metal específico. Algunas proteínas contienen más de un grupo prostético. Normalmente el grupo prostético juega un papel importante en la función biológica de la proteína.

RESUMEN 3.2 Péptidos y proteínas

- Los aminoácidos pueden unirse covalentemente para formar péptidos y proteínas. Las células contienen generalmente miles de proteínas diferentes, cada una de ellas con una actividad biológica distinta.
- Las proteínas pueden ser cadenas polipeptídicas muy largas de 100 a varios miles de residuos aminoácidos. Sin embargo, algunos péptidos naturales tienen sólo unos pocos residuos aminoácidos. Algunas proteínas

TABLA 3–4 Proteínas conjugadas

Clase	Grupo prostético	Ejemplo
Lipoproteínas	Lípidos	Lipoproteína β_1 de la sangre
Glucoproteínas	Glúcidos	Inmunoglobulina G
Fosfoproteínas	Grupos fosfato	Caseína de la leche
Hemoproteínas	Hemo (ferroporfirina)	Hemoglobina
Flavoproteínas	Nucleótidos de flavina	Succinato deshidrogenasa
Metaloproteínas	Hierro	Ferritina
	Zinc	Alcohol deshidrogenasa
	Calcio	Calmodulina
	Molibdeno	Dinitrogenasa
	Cobre	Plastocianina

están compuestas por varias cadenas polipeptídicas asociadas no covalentemente que reciben el nombre de subunidades.

- Las proteínas simples generan sólo aminoácidos después de la hidrólisis; las proteínas conjugadas contienen algún otro componente adicional, como por ejemplo un grupo prostético metálico u orgánico.

3.3 Trabajar con proteínas

El conocimiento del bioquímico sobre la estructura y función de las proteínas procede del estudio de muchas proteínas individuales. Para estudiar una proteína en detalle es necesario separarla del resto de proteínas y disponer de técnicas que permitan determinar sus propiedades. Los métodos necesarios provienen de la química de proteínas, disciplina tan antigua como la bioquímica y que mantiene una posición central en la investigación bioquímica.

Las proteínas se pueden separar y purificar

Una preparación pura de una proteína es esencial para poder determinar sus propiedades y su actividad. Puesto que las células contienen miles de tipos diferentes de proteínas, ¿cómo puede purificarse una proteína? Los métodos clásicos de separación de proteínas aprovechan propiedades que varían de una proteína a otra, entre las que se incluye el tamaño, la carga y las propiedades de unión. Algunos métodos modernos adicionales, tales como el clonaje de DNA y la secuenciación de genomas, pueden simplificar el proceso de purificación de proteínas y se presentan en el Capítulo 9.

La fuente de una proteína son generalmente células tisulares o microbianas. El primer paso en cualquier purificación de proteínas es la rotura de estas células, para liberar sus proteínas en una solución denominada **extracto crudo.** En caso necesario puede utilizarse la centrifugación diferencial para preparar fracciones subcelulares o aislar determinados orgánulos (véase la Fig. 1–8).

Una vez está a punto el extracto o la preparación de orgánulo, se dispone de diversos métodos para purificar una o más de las proteínas que contienen. Normalmente el extracto se somete a tratamientos que separan las proteínas en diferentes **fracciones** en base a alguna propiedad como el tamaño o la carga, un proceso que se denomina **fraccionamiento.** Los pasos iniciales de fraccionamiento de una purificación utilizan diferencias en la solubilidad de las proteínas, que es una compleja función del pH, temperatura, concentración de sal y otros factores. La solubilidad de las proteínas disminuye generalmente a concentraciones elevadas de sal, un efecto denominado "salting out". La adición de ciertas sales en cantidades apropiadas puede precipitar selectivamente algunas proteínas, permaneciendo las restantes en disolución. El sulfato amónico ($(NH_4)_2SO_4$) se utiliza frecuentemente para este propósito. Las proteínas así precipitadas se separan de las que permanecen disueltas mediante centrifugación a baja velocidad.

La disolución que contiene la proteína de interés debe pasar a menudo por otros procesos antes de que sean posibles pasos de purificación posteriores. La **diálisis,** por ejemplo, es un procedimiento que separa las proteínas de los disolventes aprovechando el mayor tamaño de las proteínas. El extracto parcialmente purificado se coloca en un saco o tubo de membrana semipermeable. Cuando éste se suspende en un volumen mucho mayor de disolución tamponada de fuerza iónica apropiada, la membrana permite el intercambio de sal y tampón, pero no de proteínas. De esta forma, la diálisis retiene las proteínas grandes dentro del saco o tubo de membrana, mientras que permite que la concentración de los demás solutos en la preparación de proteína cambie hasta llegar al equilibrio con la solución del exterior de la membrana. La diálisis puede utilizarse, por ejemplo, para eliminar el sulfato amónico de una preparación de proteína.

Los métodos más potentes para el fraccionamiento de proteínas utilizan la **cromatografía en columna,** que aprovecha las diferencias de carga, tamaño, afinidad de unión y otras propiedades de las proteínas (**Fig. 3–16**). Un material sólido poroso de propiedades químicas adecuadas (la fase estacionaria) se introduce en una columna, y se hace pasar a través de éste una

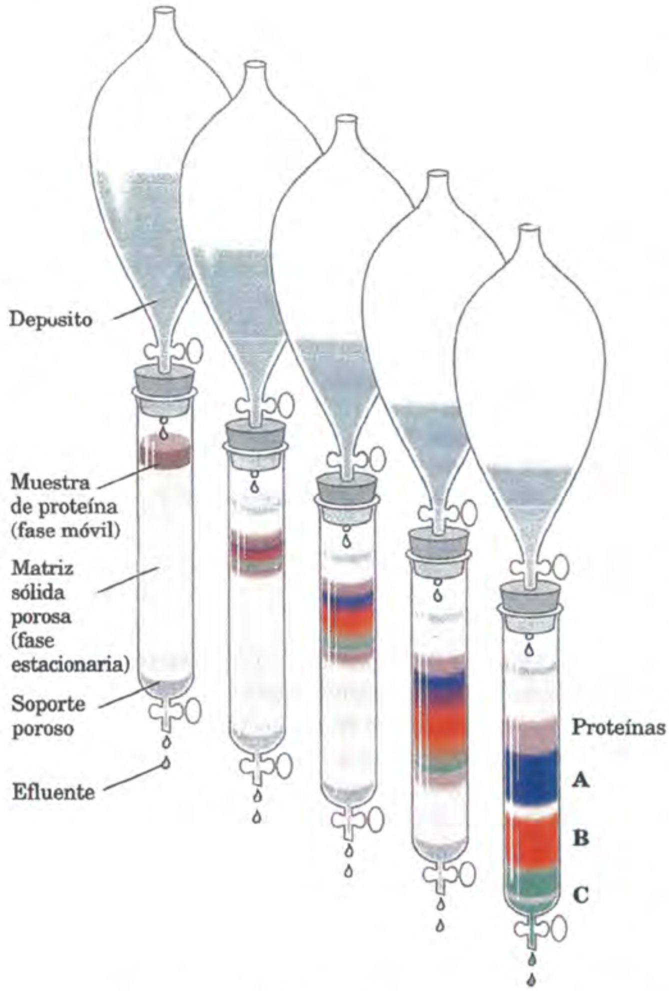


FIGURA 3–16 Cromatografía en columna. Los elementos estándar de una columna cromatográfica incluyen un material sólido y poroso (matriz) que se deposita en el interior de una columna hecha generalmente de plástico o vidrio. A través de la matriz, la fase estacionaria fluye una disolución, la fase móvil. La disolución que sale de la columna por la parte inferior (el efluente), es reemplazada constantemente por disolución suministrada de un depósito en la parte superior. La disolución de proteína a separar se deposita sobre la cabeza de la columna y se deja percolar hacia el interior de la matriz sólida. Se añade más disolución sobre ella. La disolución de proteína forma una banda dentro de la fase móvil que tiene inicialmente la anchura de la disolución de proteína aplicada a la columna. A medida que las proteínas se desplazan a través de la columna, se retardan en diferentes grados según sus diferentes interacciones con el material de la matriz. La banda de proteína se ensancha así a medida que se mueve a través de la columna. Los tipos individuales de proteínas (tales como A, B y C, mostradas en azul, rojo y verde) se separan gradualmente entre sí, formando bandas dentro de la banda más ancha de proteínas. La separación mejora (aumenta la resolución) a medida que aumenta la longitud de la columna. Sin embargo, cada banda de proteína individual también se ensancha con el tiempo debido a la difusión, un proceso que disminuye la resolución. En este ejemplo, la proteína A está bien separada de B y C, pero el ensanchamiento por difusión impide la separación completa de B y C en estas condiciones.

disolución tamponada (la fase móvil). La disolución que contiene las proteínas se introduce en la cabeza de la columna y a continuación se filtra a través de la matriz sólida, en forma de una banda que va expandiéndose continuamente dentro de la fase móvil. Las proteínas individuales migran más rápida o más lentamente a través de la columna según sus propiedades.

La **cromatografía de intercambio iónico** aprovecha las diferencias en el signo y la magnitud de las cargas eléctricas netas de las proteínas a un pH determinado. La matriz de la columna es un polímero sintético (resina) que tiene unidos grupos cargados; los que tienen unidos grupos aniónicos se denominan **intercambiadores catiónicos,** y los que tienen unidos grupos catiónicos se denominan **intercambiadores aniónicos.** La afinidad de cada proteína por los grupos cargados de la columna está afectada por el pH (que determina el estado de ionización de la molécula) y la concentración de los iones salinos libres competidores presentes en la disolución que las rodea. La separación puede optimizarse cambiando gradualmente el pH y/o la concentración de sal de la fase móvil, de forma que se cree un gradiente de pH o sal. En la **cromatografía de intercambio catiónico (Fig. 3–17a),** la matriz sólida tiene grupos cargados negativamente. En la fase móvil, las proteínas con carga neta positiva migran a través de la matriz más lentamente que las que tienen una carga neta negativa debido a que la migración de las primeras se halla retardada por sus interacciones con la fase estacionaria.

En las columnas de intercambio iónico, la expansión de la banda de proteínas en la fase móvil (la disolución de proteínas) está causada tanto por la separación de las proteínas de diferentes propiedades como por la difusión. La resolución entre dos tipos de proteínas con diferente carga neta suele mejorar a medida que se aumenta la longitud de la columna. Sin embargo, la velocidad a la que la disolución de proteínas puede pasar a través de la columna suele disminuir con la longitud de la misma. A medida que aumenta el tiempo de residencia en la columna, la resolución puede disminuir como resultado de la difusión de cada una de las bandas de proteína. Se van recogiendo porciones (fracciones) sucesivas de efluente en tubos de ensayo a medida que la solución que contiene las proteínas va saliendo de la columna. Se puede analizar cada fracción para averiguar la presencia de la proteína de interés o para conocer otras propiedades, tales como la fuerza iónica o la concentración total de proteína. Todas las fracciones que contienen la proteína de interés pueden combinarse para formar el producto de este paso cromatográfico en la purificación de la proteína.

EJEMPLO PRÁCTICO 3–1 Intercambio iónico de péptidos

Un bioquímico quiere separar dos péptidos mediante cromatografía de intercambio iónico. Al pH de la fase móvil que se va a utilizar en la columna, un péptido (A) tiene una carga neta de –3 debido a la presencia de más residuos Glu y Asp que residuos Arg, Lys e His. El péptido B tiene una carga neta de +1. ¿Qué péptido eluirá antes de una resina de intercambio catiónico? ¿Cuál de ellos eluiría primero de una resina de intercambio aniónico?

Solución: La resina de intercambio catiónico tiene cargas negativas y se une a moléculas cargadas positivamente, retardando su paso a través de la columna. El péptido B, con su carga neta positiva, interaccionará más fuertemente con la resina de

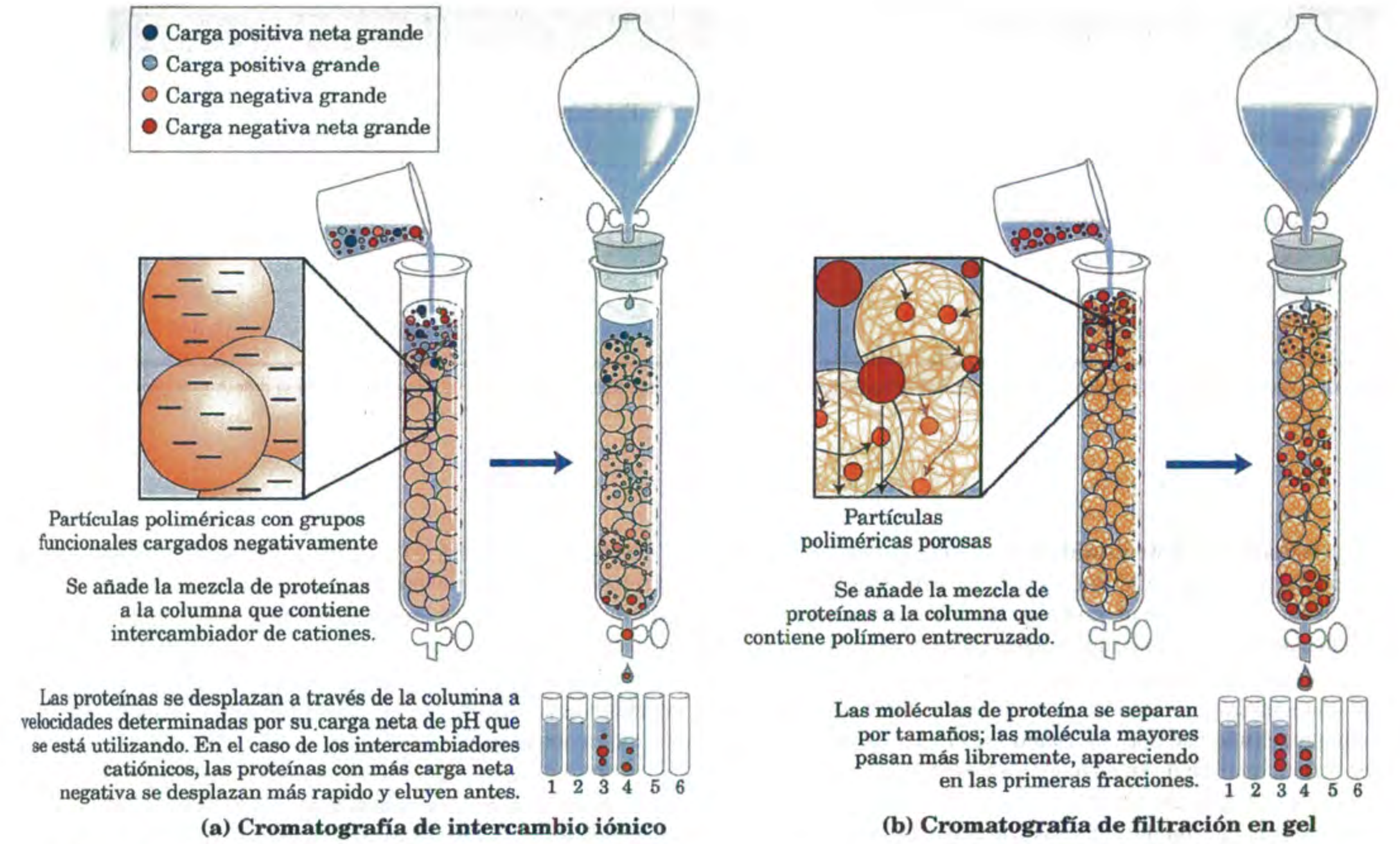
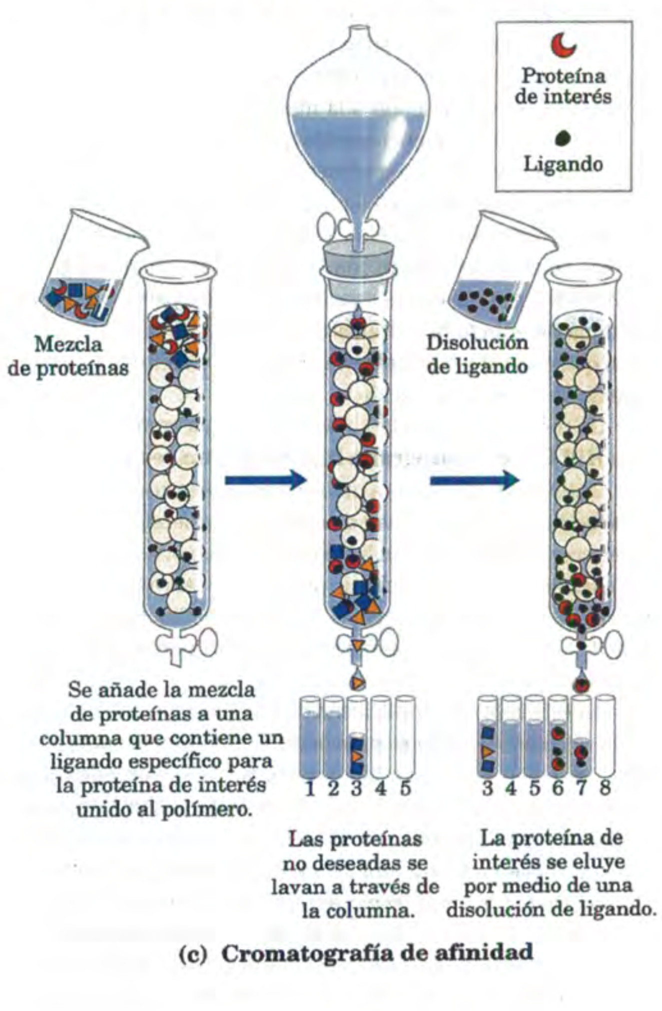


FIGURA 3–17 Tres métodos cromatográficos utilizados para la purificación de proteínas. **(a)** La cromatografía de intercambio iónico aprovecha las diferencias en el signo y la magnitud de las cargas eléctricas netas de las proteínas a un pH determinado. **(b)** La cromatografía de exclusión por tamaño, llamada también de filtración en gel, separa las proteínas en función de su tamaño. **(c)** La cromatografía de afinidad separa las proteínas en función de su especificidad de unión. En el texto se dan detalles adicionales sobre estos métodos.



intercambio catiónico que el péptido A, por lo que este último eluirá antes. El péptido B eluirá antes en la resina de intercambio aniónico. En este caso, el péptido A, de carga negativa, se encontrará retardado a causa de su interacción con la resina cargada positivamente.

La Figura 3–17 muestra otras dos variantes de cromatografía en columna además de la de intercambio iónico. La **cromatografía de exclusión molecular,** también llamada de filtración en gel (Fig. 3–17b), separa proteínas en base a su tamaño. En este método, las proteínas de mayor tamaño emergen de la columna antes que las pequeñas, una observación en cierto modo no intuitiva. La fase sólida consiste en unas pequeñas perlas hechas de material entrelazado, partículas que contienen unos poros o cavidades de tamaño calibrado. Las proteínas de mayor tamaño no pueden entrar en las cavidades, por lo que toman el camino más corto (y más rápido) a través de la columna, rodeando las partículas por el exterior. Las proteínas más pequeñas penetran en las cavidades y son retardadas a causa de su paso más laberíntico a través de la columna.

TABLA 3–5 Tabla de purificación de un enzima hipotético

Procedimiento o paso	Volumen de la fracción (mL)	Proteína total (mg)	Actividad (unidades)	Actividad específica (unidades/mg)
1. Extracto celular crudo	1.400	10.000	100.000	10
2. Precipitación con sulfato amónico	280	3.000	96.000	32
3. Cromatografía de intercambio iónico	90	400	80.000	200
4. Cromatografía de exclusión por tamaño	80	100	60.000	600
5. Cromatografía de afinidad	6	3	45.000	15.000

Nota: Todos los datos representan el estado de la muestra *después* de haber efectuado el procedimiento indicado. La actividad y la actividad específica se definen en la página 91.

La **cromatografía de afinidad** se basa en la afinidad de unión de las proteínas (Fig. 3–17c). Las partículas de la columna tienen en este caso un grupo químico unido covalentemente llamado ligando, un grupo o molécula que se une a una macromolécula, como por ejemplo una proteína. Cuando se carga una mezcla de proteínas en la columna, cualquiera de ellas que tenga afinidad por este ligando se unirá a las partículas de resina, retardando su migración a través de la columna. Por ejemplo, si la función biológica de una proteína implica unión al ATP, la fijación de ATP a las partículas de la columna dará lugar a una matriz de afinidad que servirá para purificar la proteína. Al ir pasando la solución proteica a través de la columna, las proteínas que se unen a ATP (incluida la proteína de interés) se irán uniendo a la matriz. Después de eluir las proteínas que no se unen, aquellas que sí lo han hecho se eluyen con una solución que contenga o bien una alta concentración de sal o bien el propio ligando, ATP en este caso. La sal debilita la unión de la proteína al ligando inmovilizado unido a las partículas, interfiriendo con la interacciones iónicas. El ligando libre compite con el ligando unido a las partículas de la columna, liberando la proteína de la matriz; el producto proteico que eluye de la columna se encuentra a menudo unido al ligando usado para la elución.

Un refinamiento moderno de los métodos cromatográficos es la **HPLC,** o **cromatografía líquida de alta resolución.** La HPLC utiliza bombas de alta presión que aceleran el movimiento de las moléculas de proteína en la columna, además de materiales cromatográficos de calidad superior que pueden soportar la fuerza de compresión del flujo presurizado. Al reducir el tiempo de tránsito en la columna, la HPLC puede limitar la expansión de las bandas de proteína por difusión y por tanto mejorar notablemente la resolución.

La estrategia de purificación de una proteína que no ha sido previamente aislada se guía tanto por los precedentes establecidos como por el sentido común. En la mayoría de casos deben utilizarse varios métodos diferentes consecutivos para purificar completamente una proteína, y cada uno de ellos separa proteínas en base a propiedades diferentes. Por ejemplo, si en uno de los pasos se separan proteínas de unión a ATP de otras que no lo unen, el paso siguiente deberá separar las diferentes proteínas de unión a ATP en base a su carga con el fin de aislar la proteína concreta que se desee. La elección de método es en cierto modo empírica, y puede ser necesario probar muchos protocolos antes de encontrar el más efectivo. El proceso de prueba y error puede a menudo reducirse al mínimo tomando como referencia técnicas de purificación desarrolladas para proteínas similares. Se pueden encontrar publicados protocolos de purificación para muchos millares de proteínas. El sentido común indica que se han de utilizar procedimientos baratos, como el "salting out", al principio, cuando el volumen total y el número de contaminantes son máximos. A menudo los métodos cromatográficos no son prácticos en las primeras fases debido a que la cantidad de medio cromatográfico necesario aumenta con el tamaño de la muestra. A medida que se completa cada paso de purificación, el tamaño de la muestra es generalmente menor (Tabla 3–5), lo que hace posible utilizar procedimientos cromatográficos más sofisticados (y más caros) en las etapas posteriores.

Las proteínas pueden separarse y caracterizarse por electroforesis

Otra técnica importante para la separación de proteínas se basa en el desplazamiento de las proteínas cargadas en un campo eléctrico, proceso denominado **electroforesis.** Estos procedimientos no son utilizados por lo general para purificar proteínas en grandes cantidades, dado que usualmente existen métodos alternativos más sencillos, y que los métodos electroforéticos frecuentemente afectan a la estructura y por tanto a la función de las proteínas. No obstante, la electroforesis es muy útil como método analítico. Su ventaja es que las proteínas pueden visualizarse además de separarse, lo que permite al investigador hacer una estimación rápida del número de proteínas en una mezcla o del grado de pureza de una preparación proteica determinada. La electroforesis también permite la determinación de propiedades cruciales de una proteína tales como su punto isoeléctrico y su masa molecular aproximada.

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo generalmente en geles formados por el polímero entrecruzado poliacrilamida **(Fig. 3–18).** El gel de poliacrilamida actúa como un tamiz molecular, retrasando la migración de la proteínas en una forma aproximadamente proporcional a su cociente carga/masa. La migración también puede estar afectada por la forma de la proteína. En la electroforesis, la fuerza que mueve la macromolécula es el

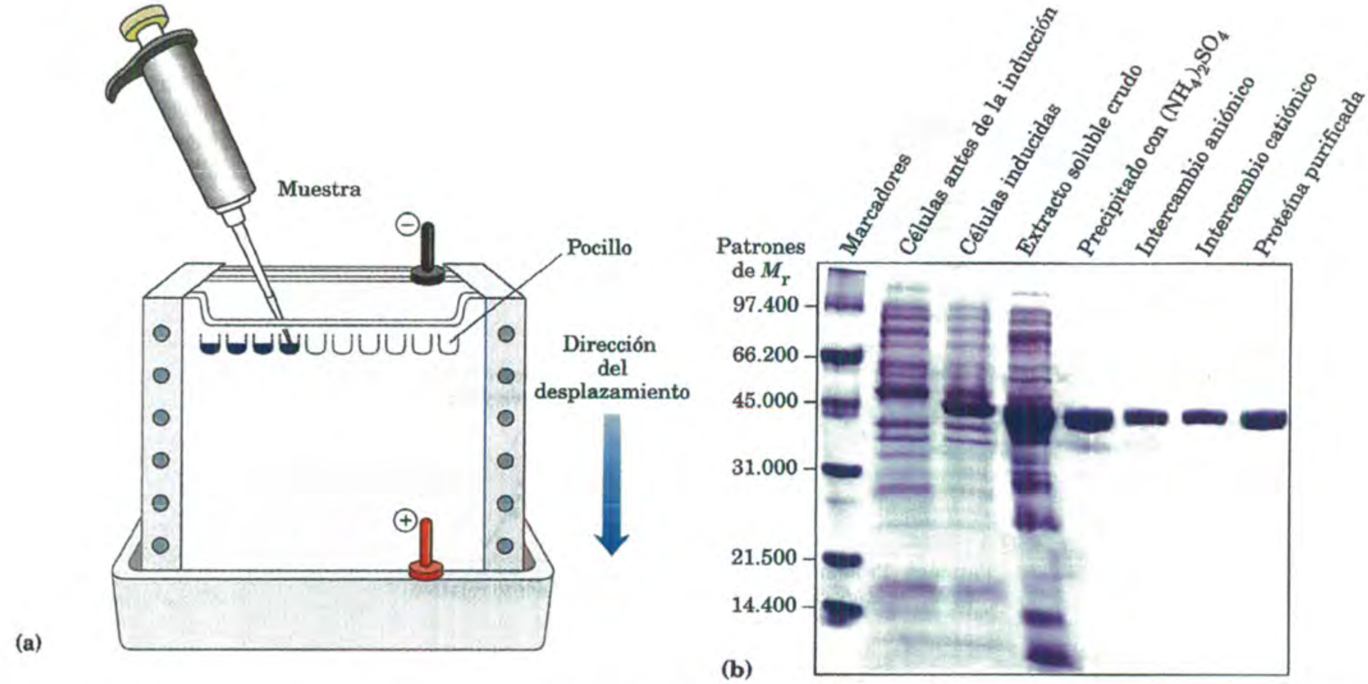


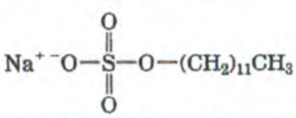
FIGURA 3–18 Electroforesis. (a) Se cargan diferentes muestras en los pocillos o depresiones en la parte superior de un gel de poliacrilamida. Las proteínas se trasladan a través del gel cuando se aplica un campo eléctrico. El gel mantiene al mínimo las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura, y también minimiza los movimientos de proteínas que no sean los producidos por el campo eléctrico. **(b)** Después de la electroforesis se pueden visualizar las proteínas tratando el gel con un colorante tal como el azul de Coomassie, que se fija a las proteínas pero no al gel. Cada banda del gel representa una proteína diferente (o subunidad proteica); las proteínas más pequeñas se desplazan más rápidamente a través del gel que las grandes, por lo que se encuentran cerca del extremo inferior del gel. Este gel ilustra la purificación la proteína RecA de *Escherichia coli* (descrita en el Capítulo 25). Se clonó el gen de la proteína RecA (Capítulo 9) para poder controlar su expresión (síntesis de la proteína). El primer carril muestra un conjunto de proteínas patrón (de M_r conocida) que sirven como marcadores de masa molecular. En los dos carriles siguientes se muestran proteínas de células de *E. coli* antes y después de la inducción de la síntesis de la proteína RecA. El cuarto carril muestra las proteínas de un extracto celular crudo. Los carriles siguientes (de izquierda a derecha) muestran la proteína presente después de cada paso sucesivo de purificación. La proteína purificada es una cadena polipeptídica única (M_r ~38.000), como puede apreciarse en el carril más a la derecha.

potencial eléctrico, E. La movilidad electroforética de la molécula μ, es el cociente entre la velocidad de la partícula, V, y el potencial eléctrico. La movilidad electroforética también es igual a la carga neta de la molécula, Z, dividida por el coeficiente friccional, f, que refleja en parte la forma de la proteína. Así:

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

El desplazamiento de una proteína en un gel durante una electroforesis es por tanto función de su tamaño y de su forma.

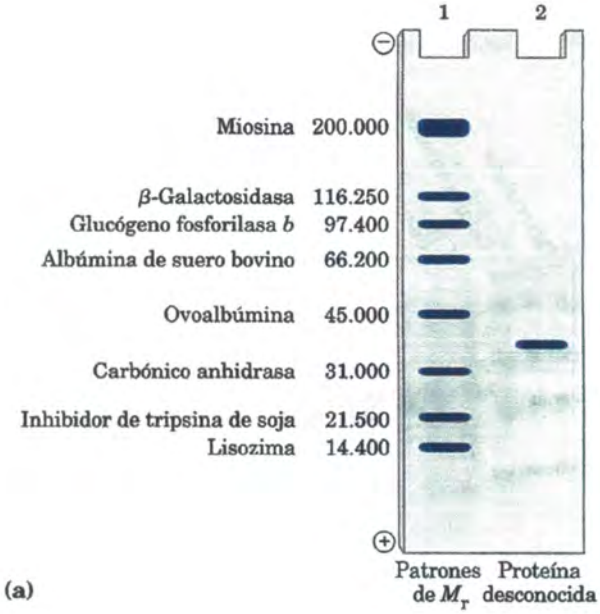
Un método electroforético comúnmente utilizado para la estimación de la pureza y la masa molecular emplea el detergente **dodecil sulfato sódico (SDS)** ("dodecil" se refiere a una cadena de 12 átomos de carbono).



Dodecil sulfato sódico (SDS)

El SDS se une a la mayoría de proteínas en una cantidad aproximadamente proporcional a la masa molecular de la proteína, alrededor de una molécula por cada dos residuos aminoácidos. El SDS ligado incorpora una gran carga neta negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante y confiere a todas las proteínas un cociente carga/masa similar. Además, la conformación nativa de la proteína se altera cuando se fija el SDS y la mayoría de las proteínas adoptan una forma similar. La electroforesis en presencia de SDS separa, por tanto, las proteínas casi exclusivamente en función de la masa (peso molecular), de forma que los polipéptidos pequeños se desplazan más rápidamente. Después de la electroforesis las proteínas se visualizan añadiendo un colorante tal como el azul Coomassie que se fija a las proteínas pero no al gel (Fig. 3–18b). De esta forma puede seguirse el progreso de un procedimiento de purificación de una proteína, ya que el número de bandas de proteína visibles en el gel debe disminuir tras cada nuevo paso de purificación. Cuando se compara con las posiciones a las que se desplazan en el gel proteínas de masa molecular conocida, la posición de una proteína desconocida puede proporcionar una medida excelente de su masa molecular **(Fig. 3–19)**. Si la proteína tiene dos o más subunidades diferentes, las subunidades se separarán generalmente a consecuencia del tratamiento con SDS y aparecerá una banda individual para cada una.

Electroforesis en gel con SDS



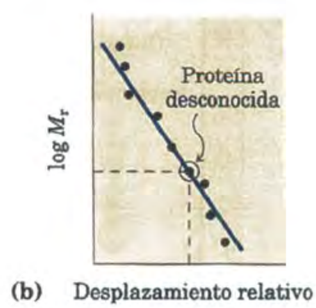


FIGURA 3–19 Determinación de la masa molecular de una proteína. La movilidad electroforética de una proteína en un gel de poliacrilamida con SDS es proporcional a su masa molecular, M_r. **(a)** Proteínas patrón de masa molecular conocida se someten a electroforesis (carril 1). Estas proteínas marcadoras se pueden utilizar para determinar la masa molecular de una proteína desconocida (carril 2). **(b)** Una gráfica del log M_r de las proteínas marcadoras frente al desplazamiento relativo durante la electroforesis es lineal, lo que permite leer la masa molecular de la proteína desconocida a partir de la gráfica.

El **enfoque isoeléctrico** se utiliza para determinar el punto isoeléctrico (pI) de una proteína **(Fig. 3–20)**. Se establece un gradiente de pH dejando que una mezcla de ácidos y bases orgánicos de baja masa molecular (anfolitos; p. 79) se distribuya espontáneamente en un campo eléctrico generado a través del gel. Cuando se aplica una mezcla de proteínas, cada una se desplaza hasta que alcanza el pH que iguala su pI (Tabla 3–6). Así las proteínas con distintos puntos isoeléctricos se distribuyen de manera diferente a lo largo del gel.

La combinación secuencial del enfoque isoeléctrico y la electroforesis en SDS en un proceso denominado **electroforesis bidimensional** permite la resolución de mezclas complejas de proteínas **(Fig. 3–21)**.

Éste es un método analítico más sensible que cualquier método electroforético individual. La electroforesis bidimensional separa proteínas de idéntica masa molecular que difieren en pI, o proteínas con valores de pI similares pero con diferentes masas moleculares.

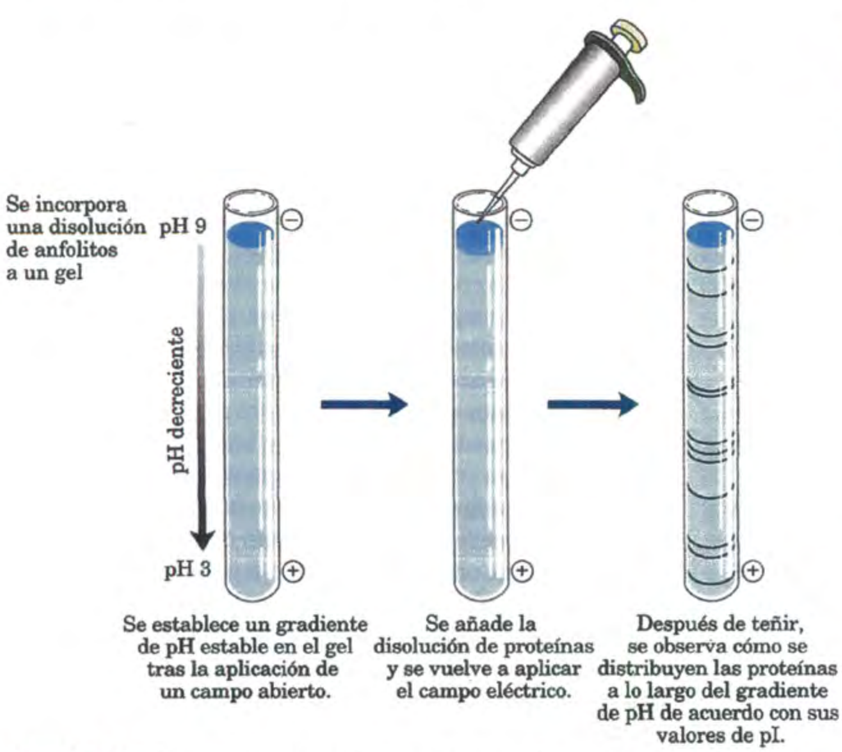
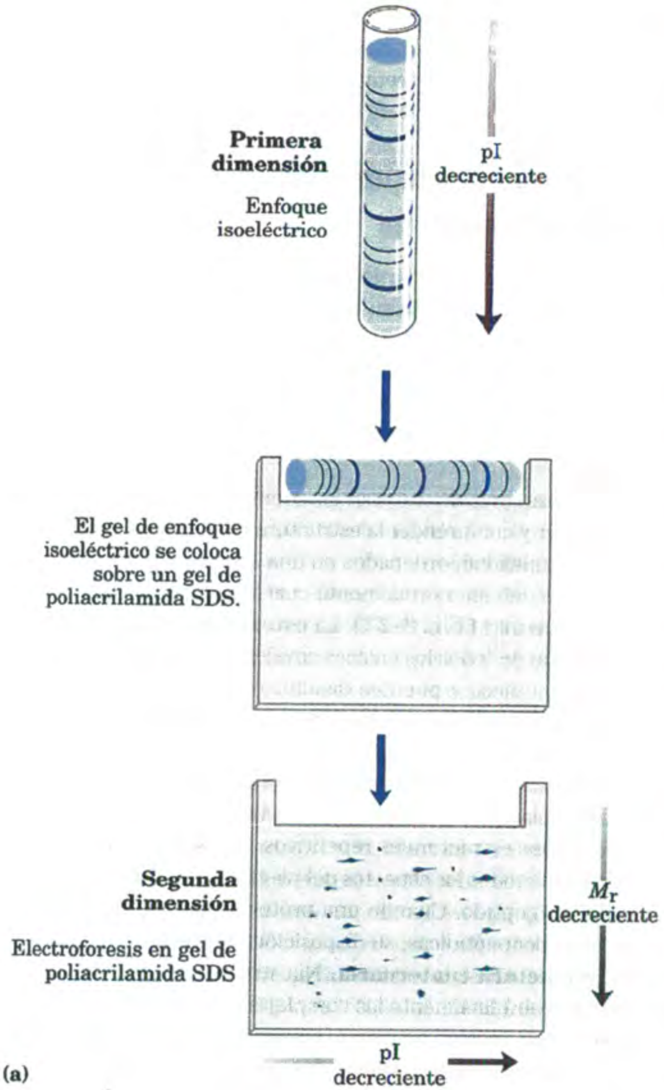


FIGURA 3–20 Enfoque isoeléctrico. Esta técnica separa las proteínas según sus puntos isoeléctricos. Se establece un gradiente estable de pH en el gel por adición de anfolitos adecuados. Se coloca una mezcla de proteínas en un pocillo del gel. Con la aplicación de un campo eléctrico, las proteínas entran en el gel y se desplazan hasta alcanzar un pH equivalente a su pI. Recuérdese que la carga neta de una proteína es cero cuando pH = pI.

TABLA 3–6 Punto isoeléctrico de algunas proteínas

Proteína	pI
Pepsina	<1,0
Albúmina de huevo	4,6
Albúmina sérica	4,9
Ureasa	5,0
β-Lactoglobulina	5,2
Hemoglobina	6,8
Mioglobina	7,0
Quimotripsinógeno	9,5
Citocromo *c*	10,7
Lisozima	11,0



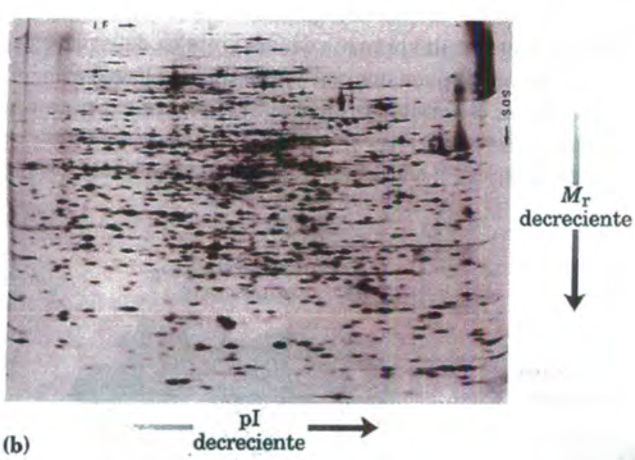


FIGURA 3–21 Electroforesis bidimensional. **(a)** Las proteínas se separan primero mediante enfoque isoeléctrico en un gel cilíndrico. A continuación se extiende el gel horizontalmente sobre un segundo gel, en forma de plancha, y las proteínas se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. La separación horizontal refleja las diferencias de pI; la vertical refleja las diferencias en masa molecular. **(b)** Utilizando esta técnica se pueden separar más de 1.000 proteínas diferentes de *E. coli*.

Es posible cuantificar las proteínas no aisladas

A fin de purificar una proteína es esencial disponer de un método para detectar y cuantificar dicha proteína en presencia de muchas proteínas más en cada etapa del proceso. A menudo, la purificación debe realizarse en ausencia de cualquier información sobre el tamaño y las propiedades físicas de la proteína, o sobre la fracción que representa sobre la masa total de proteína en el extracto. En el caso de proteínas enzimáticas, se puede determinar la cantidad de enzima en una disolución o extracto de tejido determinados en función del efecto catalítico que produce el enzima, es decir, el *incremento* de la velocidad a la cual su sustrato se convierte en productos de la reacción cuando está presente el enzima. Con este fin deben conocerse (1) la ecuación global de la reacción catalizada, (2) un procedimiento analítico para determinar la desaparición del sustrato o la aparición de un producto de la reacción, (3) si el enzima requiere cofactores tales como iones metálicos o coenzimas, (4) la dependencia de la actividad enzimática respecto de la concentración de sustrato, (5) el pH óptimo y (6) una zona de temperatura en la cual el enzima sea estable y tenga una actividad elevada. Los enzimas se ensayan normalmente en su pH óptimo y a una temperatura conveniente dentro del intervalo de 25 a 38 °C. También se requieren generalmente elevadas concentraciones de sustrato de modo que la velocidad inicial de reacción, que se mide experimentalmente, sea proporcional a la concentración de enzima (Capítulo 6).

Por acuerdo internacional, se define 1,0 unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que produce la transformación de 1,0 μmol de sustrato por minuto a 25 °C en condiciones óptimas de medida. El término **actividad** se refiere a las unidades totales de enzima en una solución. La **actividad específica** es el número de unidades enzimáticas por miligramo de proteína **(Fig. 3–22)**. La actividad específica constituye una medida de la pureza enzimática: aumenta durante la purificación de una enzima, y llega a ser máxima y constante cuando el enzima es puro (Tabla 3–5, p. 88).

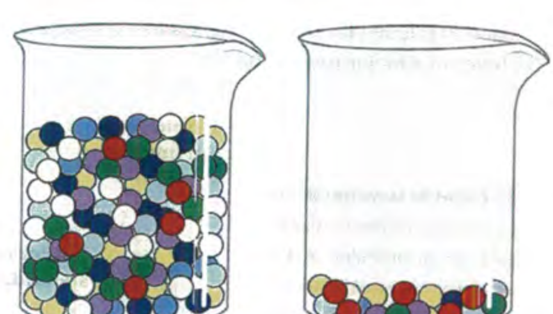


FIGURA 3–22 Actividad frente a actividad específica. Se puede ilustrar la diferencia entre estos dos términos considerando dos recipientes con canicas. Ambos contienen el mismo número de canicas rojas, pero cantidades diferentes de canicas de otros colores. Si se considera que las canicas representan proteínas, ambos recipientes contienen la misma *actividad* de la proteína representada por las canicas rojas. No obstante, el segundo recipiente tiene una *actividad específica* mayor debido a que las canicas rojas son una fracción mucho mayor del total.

Después de cada paso de purificación, se determina la actividad de la preparación (en unidades de actividad enzimática), se determina independientemente la cantidad total de proteína y se calcula el cociente de los dos valores da la actividad específica. La actividad y la proteína total generalmente disminuyen en cada paso. La actividad disminuye porque siempre se produce alguna pérdida debido a inactivación o a interacciones no óptimas con los materiales cromatográficos o con otras moléculas de la disolución. La proteína total disminuye porque el objetivo es eliminar tanta proteína no deseada o no específica como sea posible. En un paso de purificación exitoso, la pérdida de proteína no específica es mucho mayor que la pérdida de actividad; por tanto, aun cuando la actividad total disminuye, la actividad específica aumenta. Los datos se recogen finalmente en una tabla de purificación similar a la Tabla 3–5. Generalmente se considera que una proteína es pura cuando pasos adicionales de purificación no consiguen aumentar su actividad específica y cuando sólo se puede detectar una especie proteica (mediante electroforesis, por ejemplo).

En el caso de proteínas que no sean enzimas se requieren otros métodos de cuantificación. Las proteínas de transporte pueden determinarse por su unión a la molécula que transportan, y las hormonas y las toxinas por los efectos biológicos que producen; por ejemplo, las hormonas de crecimiento estimulan el crecimiento de ciertas células cultivadas. Algunas proteínas estructurales representan una fracción tan grande de la masa tisular que pueden extraerse y purificarse fácilmente sin necesidad de un ensayo funcional. Los métodos son tan variados como las propias proteínas.

RESUMEN 3.3 Trabajar con proteínas

- Las proteínas se separan y purifican en base a diferencias en sus propiedades. Las proteínas se pueden precipitar selectivamente mediante la adición de ciertas sales. Existe una amplia gama de métodos cromatográficos que explotan las diferencias de tamaño, afinidad de unión, carga y otras propiedades. Entre estos métodos se incluyen la cromatografía de intercambio iónico, de exclusión molecular, de afinidad y la cromatografía líquida de alta resolución.
- La electroforesis separa proteínas en base a su masa o a su carga. La electroforesis en gel con SDS y el enfoque isoeléctrico se pueden utilizar por separado o combinados para obtener una mejor resolución.
- Todos los procedimientos de purificación requieren un método para cuantificar o distinguir la proteína de interés en presencia de otras proteínas. La purificación puede seguirse mediante el ensayo de la actividad específica.

3.4 Estructura de las proteínas: estructura primaria

La purificación de una proteína generalmente es sólo el preludio de una disección detallada de su estructura y función. ¿Qué es lo que hace que una proteína sea un enzima, otra una hormona, otra una proteína estructural y otra un anticuerpo? ¿Cómo se diferencian químicamente? Las diferencias más obvias son estructurales, y es de estructura de proteínas de lo que hablaremos ahora.

Para las macromoléculas grandes como las proteínas, la tarea de describir y comprender la estructura se aborda en varios niveles de complejidad, ordenados en una especie de jerarquía conceptual. Se definen normalmente cuatro niveles de estructura de las proteínas **(Fig. 3–23)**. La **estructura primaria** es una descripción de todos los enlaces covalentes (principalmente enlaces peptídicos y puentes disulfuro) que unen los aminoácidos de una cadena polipeptídica. El elemento más importante de la estructura primaria es la *secuencia* de los residuos aminoácidos. La **estructura secundaria** se refiere a disposiciones particularmente estables de los aminoácidos que dan lugar a patrones estructurales repetitivos. La **estructura terciaria** describe todos los aspectos del plegamiento tridimensional de un polipéptido. Cuando una proteína posee dos o más subunidades polipeptídicas, su disposición en el espacio se denomina **estructura cuaternaria.** Nuestra exploración de las proteínas incluirá finalmente las complejas máquinas proteicas compuestas por docenas o miles de subunidades. En lo que resta de capítulo nos concentraremos en la estructura primaria; los niveles superiores de estructura se discuten en el Capítulo 4.

Las diferencias en la estructura primaria pueden ser especialmente informativas. Cada proteína tiene un número y secuencia distintivos de residuos aminoácidos. Como veremos en el Capítulo 4, la estructura primaria de una proteína determina la forma en que se pliega en una estructura tridimensional única y ésta, a su vez, determina la función de la proteína. Consideraremos en primer lugar las indicaciones empíricas sobre la estrecha relación entre secuencia de aminoácidos y función

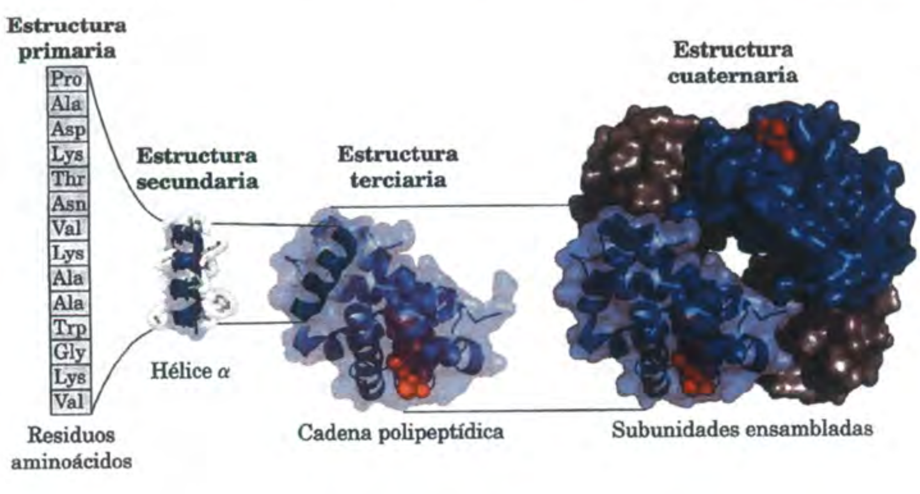


FIGURA 3–23 Niveles de estructura de las proteínas. La *estructura primaria* consiste en una secuencia de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos e incluye los puentes disulfuro que existan. El polipéptido resultante puede estar enrollado en unidades de *estructura secundaria*, tales como una hélice α. La hélice es una parte de la *estructura terciaria* del polipéptido plegado, el cual es en sí mismo una de las subunidades que constituyen la *estructura cuaternaria* de una proteína multisubunidad, en este caso la hemoglobina.

proteica, para continuar describiendo cómo se determina la secuencia de aminoácidos; finalmente, describiremos los usos que se puede dar a esta información.

La función de una proteína depende de su secuencia de aminoácidos

La bacteria *Escherichia coli* produce más de 3.000 proteínas diferentes; un ser humano tiene unos 25.000 genes que codifican un número muy superior de proteínas diferentes (mediante procesos genéticos descritos en la Parte III de este libro). En ambos casos cada tipo de proteína tiene una estructura tridimensional única que le confiere una función única. Cada tipo de proteína también tiene una secuencia de aminoácidos única. La intuición sugiere que la secuencia de aminoácidos debe desempeñar un papel fundamental en la determinación de la estructura tridimensional de la proteína y en último término su función, pero ¿es correcta esta suposición? Una observación general sobre las proteínas y sobre sus variaciones en la secuencia de aminoácidos proporciona una serie de pistas empíricas que ayudan a sustanciar la importante relación entre secuencia de aminoácidos y función biológica.

Primero, tal como ya hemos visto, proteínas con funciones diferentes siempre tienen secuencias de aminoácidos diferentes. En segundo lugar, se han correlacionado miles de enfermedades genéticas humanas con la producción de proteínas defectuosas. El defecto puede ir desde un único cambio en la secuencia de aminoácidos (como en la anemia falciforme, descrita en el Capítulo 5) a la eliminación de una parte mayor de la cadena polipeptídica (como en la mayoría de casos de distrofia muscular de Duchenne: una eliminación de una gran porción del gen que codifica la proteína distrofina da lugar a la producción de una proteína más corta e inactiva). Sabemos, por tanto, que si se altera la estructura primaria, la función de la proteína también puede cambiar. Finalmente, al comparar proteínas con funciones similares de diferentes especies encontramos que estas proteínas tienen a menudo secuencias de aminoácidos similares. Un caso extremo es la ubiquitina, una proteína de 76 residuos aminoácidos implicada en la regulación de la degradación de otras proteínas. La secuencia de aminoácidos de la ubiquitina es idéntica en especies tan dispares como la mosca del vinagre y el ser humano.

La secuencia de aminoácidos de una proteína ¿está fijada absolutamente, es decir, es invariable para una proteína concreta? No; es posible cierta flexibilidad. Se calcula que entre el 20 y el 30% de las proteínas humanas son **polimórficas,** habiendo secuencias de aminoácidos que varían dentro de la población humana. Muchas de estas variaciones de secuencia no tienen ningún efecto, o muy poco, sobre la función de la proteína. Además, proteínas que llevan a cabo una función similar en especies distantes pueden diferir de manera importante en el tamaño global y en la secuencia de aminoácidos.

A pesar de que la secuencia de aminoácidos puede variar considerablemente en algunas regiones de la estructura primaria sin afectar a la función biológica, las proteínas contienen a menudo regiones cruciales que son esenciales para su función y cuya secuencia se encuentra, por tanto, conservada. La fracción de secuencia que es crítica varía de proteína a proteína, lo que complica la tarea de relacionar secuencia con estructura tridimensional y estructura con función. No obstante, antes de poder profundizar en este problema, hemos de examinar de qué forma se obtiene la información sobre la secuencia.

Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de millones de proteínas

Dos importantes descubrimientos que tuvieron lugar en 1953 fueron de importancia crucial en la historia de la bioquímica. En aquel año James D. Watson y Francis Crick dedujeron la estructura en doble hélice del DNA y propusieron una base estructural que explicaba su precisa replicación (Capítulo 8). Su propuesta aclaró la realidad molecular que estaba detrás de la idea

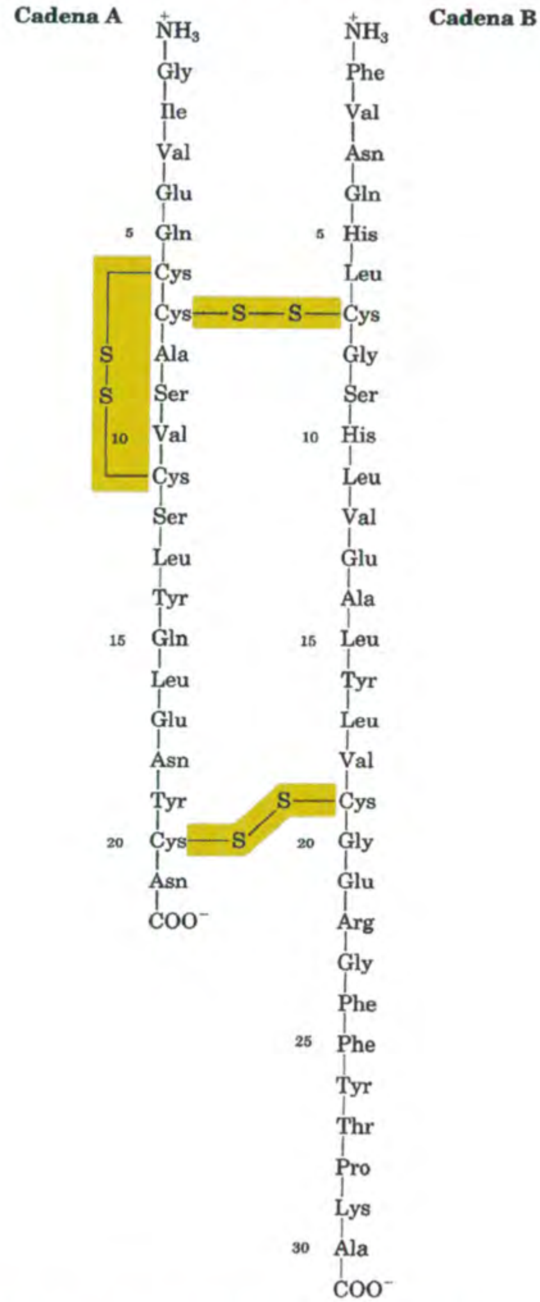
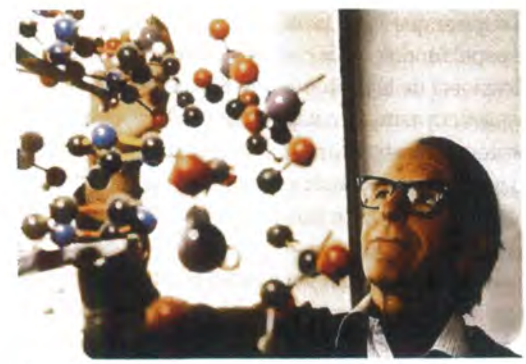


FIGURA 3–24 Secuencia de aminoácidos de la insulina bovina. Las dos cadenas polipeptídicas están unidas por enlaces disulfuro cruzados. La cadena A es idéntica en las insulinas humana, de cerdo, perro, conejo y cachalote. Las cadenas B de vaca, cerdo, perro, cabra y caballo son idénticas.

de gen. En aquel mismo año, Frederick Sanger resolvió la secuencia de aminoácidos de las cadenas peptídicas de la hormona insulina **(Fig. 3–24)**, sorprendiendo a muchos investigadores que habían creído durante mucho tiempo que la elucidación de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido sería una tarea descorazonadoramente difícil. Rápidamente se hizo evidente que la secuencia de nucleótidos del DNA y la secuencia de aminoácidos de las proteínas estaban relacionadas de algún modo. Tan sólo una década después de estos descubrimientos se había determinado el código genético que relaciona la secuencia nucleotídica del DNA con la secuencia de aminoácidos de las moléculas proteicas (Capítulo 27). Gracias al rápido incremento de las bases de datos genómicos es posible derivar las secuencias de un enorme número de proteínas de forma indirecta a partir de las secuencias de DNA. Sin embargo, la moderna química de proteínas sigue utilizando con frecuencia los métodos tradicionales de secuenciación de polipéptidos, capaces de revelar detalles no deducibles de la secuencia de nucleótidos, como por ejemplo las modificaciones que tienen lugar después de la síntesis del polipéptido. Actualmente la secuenciación química de proteínas complementa las metodologías más novedosas y proporciona múltiples vías para obtener datos de secuencia de aminoácidos. Estos datos son de importancia crítica para cualquier área de la investigación bioquímica.

Los polipéptidos cortos se secuencian utilizando procedimientos automáticos

Para analizar la estructura primaria de una proteína se utilizan diversos procedimientos. Para empezar, se dispone de diversos protocolos para marcar e identificar el residuo amino-terminal **(Fig. 3–25a)**. Sanger desarrolló el reactivo 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB) con este fin; otros reactivos utilizados son el cloruro de dansilo y el cloruro de dabsilo, que generan derivados más fácilmente detectables que los derivados dinitrofeni-



Frederick Sanger

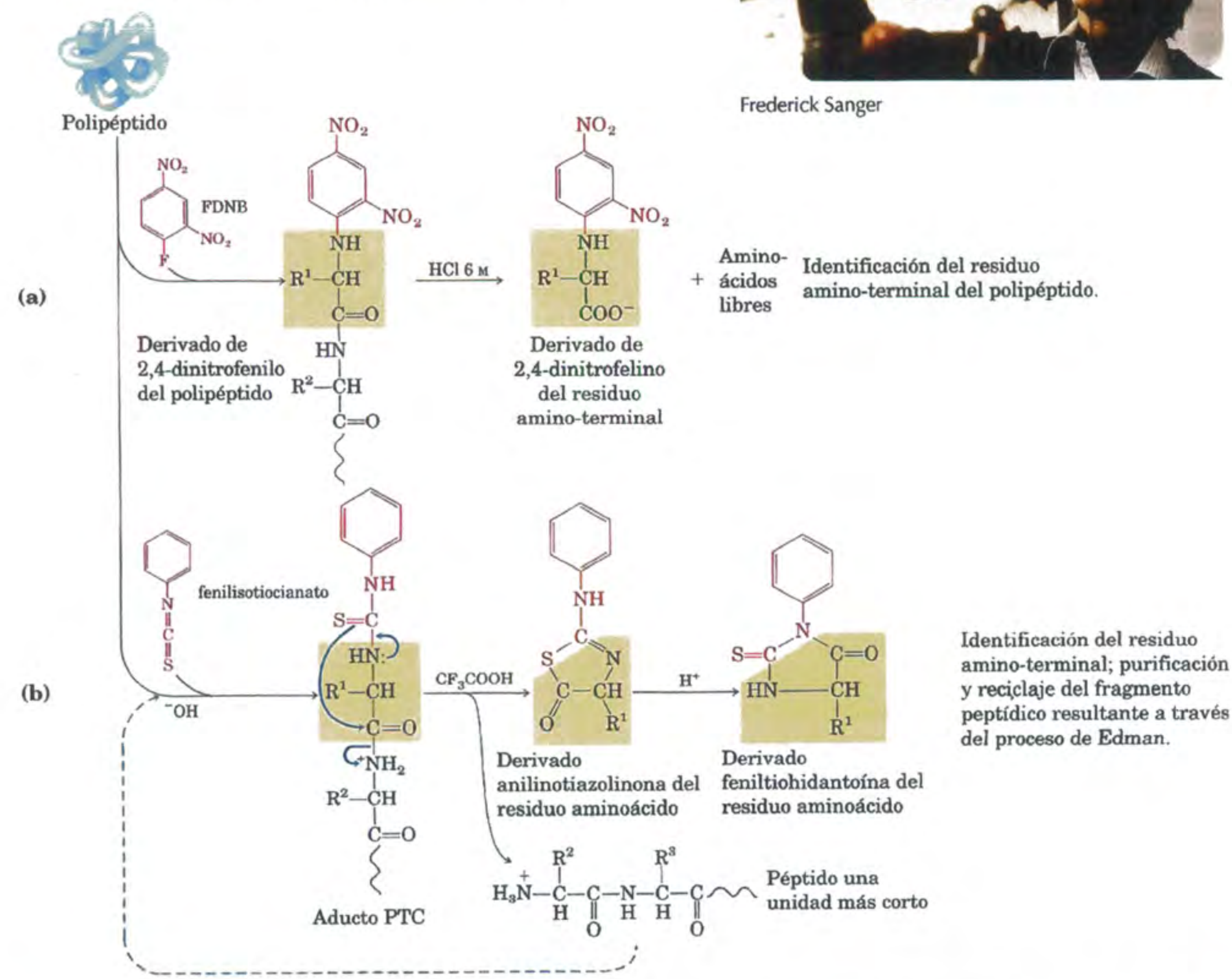
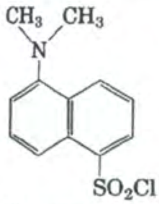
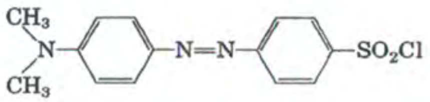


FIGURA 3–25 Pasos en la secuenciación de un polipéptido. (a) La identificación del residuo amino-terminal puede ser el primer paso de la secuenciación de un polipéptido. Aquí se muestra el método de Sanger para identificar el residuo amino-terminal. **(b)** El procedimiento de la degradación de Edman permite obtener la secuencia completa de un péptido. En el caso de péptidos cortos este método por sí solo da la secuencia completa, por lo que frecuentemente se omite el paso **(a)**. El paso **(a)** resulta útil en el caso de polipéptidos de gran tamaño que a menudo se fragmentan en péptidos más pequeños para su secuenciación (véase la Fig. 3–27).

lados. Una vez que se ha marcado el residuo amino-terminal con uno de estos reactivos, se hidroliza el polipéptido (en HCl 6M) para obtener sus aminoácidos constituyentes y se identifica el aminoácido marcado. Dado que la etapa de hidrólisis destruye el polipéptido, este procedimiento no puede utilizarse para secuenciar un polipéptido más allá de su residuo amino-terminal. Sin embargo, puede ayudar a determinar el número de polipéptidos químicamente diferentes en una proteína, siempre que cada uno tenga un residuo amino-terminal diferente. Por ejemplo, si la insulina se somete a este procedimiento se marcarían dos residuos, Phe y Gly (Fig. 3–24).


Cloruro de dansilo


Cloruro de dabsilo

Para secuenciar un polipéptido completo se utiliza normalmente un método químico diseñado por Pehr Edman. El procedimiento de la **degradación de Edman,** marca y elimina sólo el residuo amino-terminal de un péptido, dejando el resto de enlaces peptídicos intactos (Fig. 3–25b). Se hace reaccionar el péptido con fenilisotiocianato en condiciones alcalinas suaves, lo que convierte el aminoácido amino-terminal en un aducto feniltiocarbamilo (PTC). El enlace peptídico contiguo al aducto de PTC se rompe a continuación mediante reacción en ácido trifluoroacético anhidro, que conlleva la eliminación del aminoácido amino-terminal en forma de anilinotiazolinona. El aminoácido modificado se extrae con disolventes orgánicos, se convierte en un derivado más estable, feniltiohidantoína, mediante tratamiento con ácido en disolución acuosa y finalmente se identifica. El uso de reacciones secuenciales llevadas a cabo primero en condiciones básicas y a continuación en condiciones acídicas proporciona un control adecuado sobre todo el proceso. Cada una de las reacciones del aminoácido amino-terminal puede completarse prácticamente en su totalidad sin afectar a ninguno de los demás enlaces del péptido. Después de la eliminación e identificación del residuo amino-terminal, el *nuevo* residuo amino-terminal puede ser marcado, eliminado e identificado a través de la misma serie de reacciones. Este procedimiento se repite hasta que se ha determinado toda la secuencia. La degradación de Edman se realiza en un instrumento, denominado **secuenciador,** que mezcla los reactivos en las proporciones adecuadas, separa los productos, los identifica y registra los resultados. Estos métodos son extraordinariamente sensibles. A menudo puede determinarse la secuencia aminoácida completa a partir de unos pocos microgramos de proteína.

La longitud de polipéptido que puede secuenciarse con precisión mediante la degradación de Edman depende de la eficiencia de los pasos químicos individuales. Consideremos un péptido que empiece con la secuencia Gly–Pro–Lys– en su extremo amino. Si la glicina se eliminara con una eficiencia del 97%, el 3% de las moléculas del polipéptido en la solución mantendrían un residuo de Gly en su extremo amino. En el segundo ciclo de Edman, el 94% de los aminoácidos liberados sería prolina (se eliminaría el 97% de residuos de Pro del 97% de moléculas terminadas en Pro) y el 2,9% glicina (se eliminaría el 97% de los residuos de Gly del 3% de moléculas que mantendrían su extremo terminal de Gly), mientras que un 3% de moléculas del polipéptido mantendrían residuos de Gly (0,1%) o Pro (2,9%) en su extremo amino. En cada ciclo, los péptidos que no han reaccionado en los ciclos anteriores aportarán aminoácidos a un fondo que crece continuamente, haciendo finalmente imposible determinar cuál es el siguiente aminoácido en la secuencia peptídica original. Los secuenciadores modernos alcanzan eficiencias superiores al 99% por ciclo, permitiendo secuenciar más de 50 residuos aminoácidos contiguos de un polipéptido. La estructura primaria de la insulina, resuelta por Sanger y colaboradores a lo largo de un período de 10 años, podría ser ahora determinada por completo en un día o dos mediante secuenciación directa en un secuenciador. (Tal como discutiremos en el Capítulo 8, la secuenciación del DNA es todavía más eficiente.)

Las proteínas grandes deben secuenciarse a partir de fragmentos más pequeños

La precisión global en la determinación de una secuencia de aminoácidos disminuye generalmente a medida que aumenta la longitud del polipéptido. Los largos polipéptidos de las proteínas han de romperse en trozos más pequeños para poder secuenciarlos de manera eficiente. Este proceso consta de varios pasos. En primer lugar se rompe la proteína en un conjunto de fragmentos específicos mediante métodos químicos o enzimáticos. Si existen puentes disulfuro, es necesario romperlos. A continuación se purifica cada fragmento y se secuencia mediante el procedimiento de Edman. Finalmente se determina el orden en que los fragmentos aparecen en la proteína original y se determina donde están localizados, si es que los hay, los enlaces disulfuro.

Rotura de los enlaces disulfuro Los puentes disulfuro interfieren en el procedimiento de secuenciación. Un residuo de cistina (Fig. 3–7) al que se cortara uno de sus enlaces peptídicos mediante el procedimiento de Edman, podría permanecer unido a otra cadena polipeptídica a través de su puente disulfuro. Los puentes disulfuro también interfieren en la rotura enzimática o química del polipéptido. En la **Figura 3–26** se esquematizan dos métodos utilizados para romper enlaces disulfuro de manera irreversible.

Rotura de la cadena polipeptídica Pueden utilizarse varios métodos para fragmentar la cadena polipeptídica. Los enzimas denominados **proteasas** catalizan la rotura hidrolítica de los enlaces peptídicos. Algunas proteasas cortan solamente los enlaces peptídicos adyacentes a residuos aminoácidos específicos (Tabla 3–7) y por tanto fragmentan una cadena polipeptídica de forma predecible y reproducible. Varios reactivos químicos cortan también los enlaces peptídicos adyacentes a residuos específicos.

Entre las proteasas, el enzima digestivo tripsina sólo cataliza la hidrólisis de aquellos enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo está proporcionado por un residuo de Lys o Arg, independientemente de la longitud o secuencia de ami-

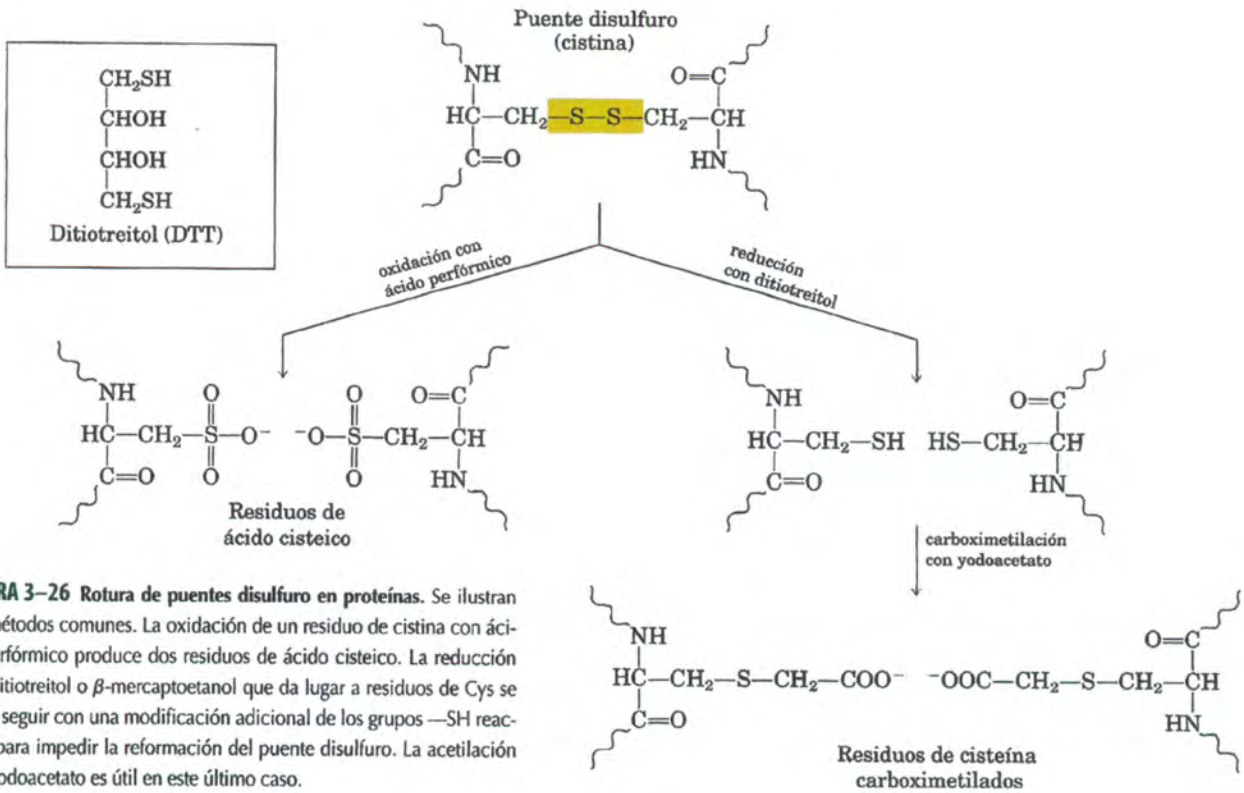


FIGURA 3–26 Rotura de puentes disulfuro en proteínas. Se ilustran dos métodos comunes. La oxidación de un residuo de cistina con ácido perfórmico produce dos residuos de ácido cisteico. La reducción con ditiotreitol o β-mercaptoetanol que da lugar a residuos de Cys se ha de seguir con una modificación adicional de los grupos —SH reactivos para impedir la reformación del puente disulfuro. La acetilación con yodoacetato es útil en este último caso.

TABLA 3–7 Especificidad de algunos métodos usuales de fragmentación de cadenas polipeptídicas

Tratamiento (origen biológico)*	Puntos de corte†
Tripsina (páncreas bovino)	Lys, Arg (C)
Proteasa de *Submaxillarus* (glándula submaxilar de ratón)	Arg (C)
Quimotripsina (páncreas bovino)	Phe, Trp, Tyr (C)
Proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (bacteria *S. aureus*)	Asp, Glu (C)
Proteasa Asp-*N* (bacteria *Pseudomonas fragi*)	Asp, Glu (N)
Pepsina (estómago porcino)	Leu, Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinasa Lys C (bacteria *Lysobacter enzymogenes*)	Lys (C)
Bromuro de cianógeno	Met (C)

*A excepción del bromuro de cianógeno son todos proteasas. Todos pueden obtenerse comercialmente.

† Residuos que aportan el punto de reconocimiento primario para la proteasa o el reactivo; la rotura del enlace peptídico tiene lugar en el lado carbonilo (C) o amino (N) del residuo aminoácido indicado.

noácidos de la cadena. De este modo puede predecirse el número de péptidos de menor tamaño producidos por rotura con tripsina a partir del número total de residuos de Lys o Arg en el polipéptido original, determinado a partir de la hidrólisis de una muestra intacta **(Fig. 3–27)**. Un polipéptido con tres residuos de Lys y/o Arg (como en la Fig. 3–27) dará lugar normalmente a cuatro péptidos más pequeños al ser cortado por la tripsina. Además, todos excepto uno tendrán una Lys o Arg como carboxilo-terminal. Los fragmentos producidos por acción de la tripsina (u otro enzima o reactivo químico) se separan a continuación mediante métodos cromatográficos o electroforéticos.

Secuenciación de los péptidos Todos los fragmentos peptídicos resultantes de la acción de la tripsina se secuencian separadamente por el procedimiento de Edman.

Ordenación de los fragmentos peptídicos Ahora debe determinarse el orden de estos "fragmentos trípticos" en la cadena polipeptídica original. Se corta otra muestra del polipéptidointacto en fragmentos utilizando un enzima o reactivo *diferente*, que corte enlaces peptídicos en puntos diferentes a los cortados por la tripsina. Por ejemplo, el bromuro de cianógeno sólo rompe aquellos enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo es aportado por Met. Los fragmentos resultantes

de este segundo procedimiento se separan y secuencian igual que los anteriores.

Se examinan las secuencias de aminoácidos de cada fragmento obtenido con los dos procedimientos de rotura con el fin de encontrar péptidos producto del segundo procedimiento cuyas secuencias establezcan una continuidad, debido al solapamiento, entre los fragmentos obtenidos por el primer procedimiento de rotura (Fig. 3–27). Los péptidos solapantes obtenidos a partir de la segunda fragmentación dan el orden correcto de los fragmentos peptídicos obtenidos en la primera. Si se ha identificado el aminoácido amino-terminal previamente a la primera hidrólisis de la proteína, se puede utilizar esta información para establecer cuál es el fragmento que proviene del extremo amino. Se pueden comparar los dos conjuntos de fragmentos para detectar posibles errores al determinar la secuencia de aminoácidos de cada fragmento. Si el segundo procedimiento de rotura no consigue establecer continuidad entre todos los péptidos de la primera rotura, deberá utilizarse un tercero o incluso un cuarto método de rotura para obtener un conjunto de péptidos que pueda proporcionar los solapamientos necesarios.

Localización de los puentes disulfuro Si la estructura primaria incluye puentes disulfuro, su localización se determina en un paso adicional una vez completada la secuenciación. De nuevo se corta una muestra de la proteína con un reactivo tal como la tripsina, pero esta vez sin romper los puentes disulfuro. Los péptidos resultantes se separan por electroforesis y se comparan con el

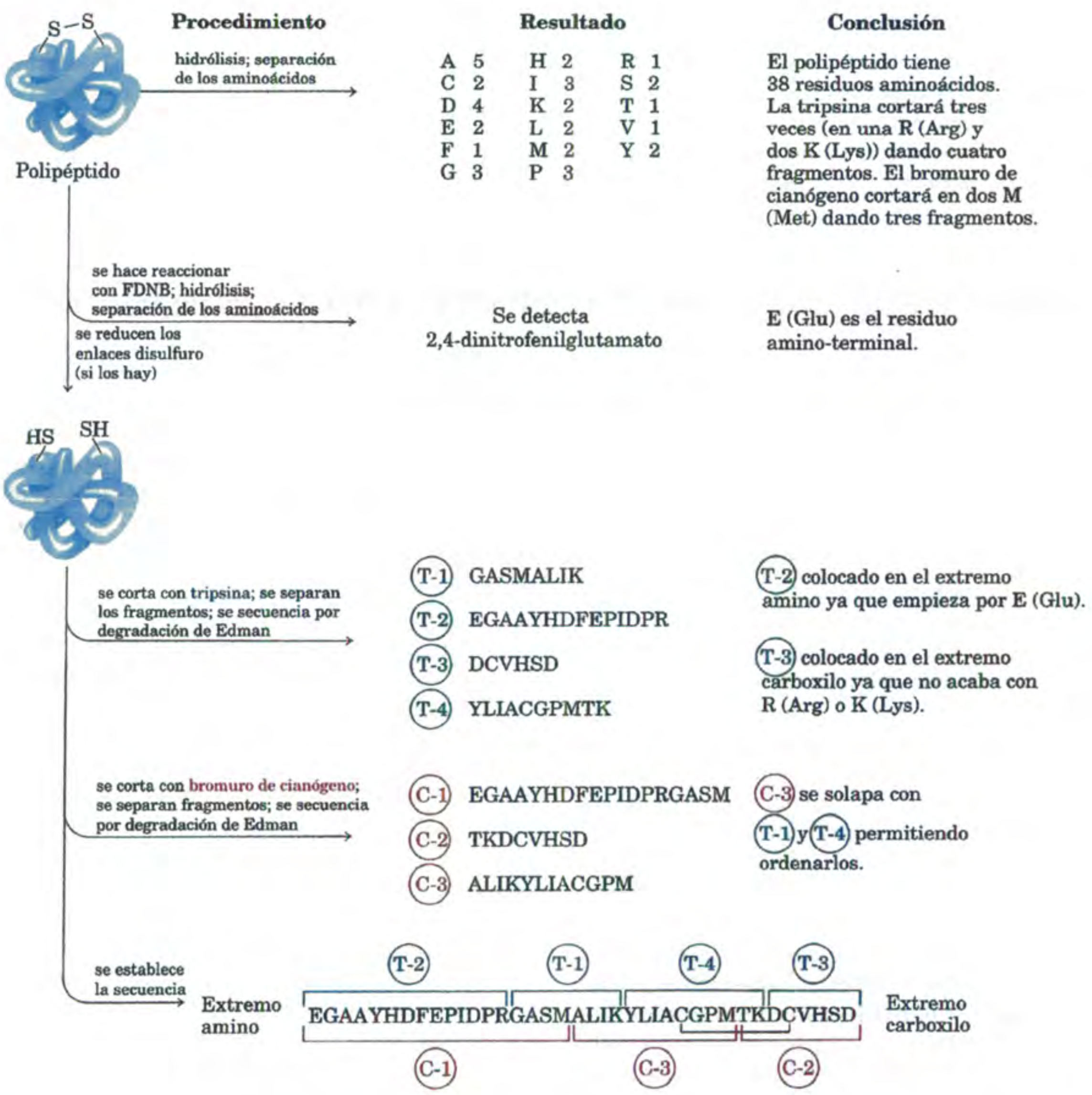


FIGURA 3–27 Fragmentación de las proteínas, secuenciación y ordenación de los fragmentos peptídicos. Se determina en primer lugar la composición de aminoácidos y el residuo N-terminal de una muestra intacta. A continuación se rompen los puentes disulfuro presentes antes de la fragmentación de forma que la secuenciación pueda transcurrir con eficiencia. En el ejemplo aquí mostrado, sólo hay dos residuos Cys (C), por lo que sólo hay una posibilidad de localización del puente disulfuro. En los polipéptidos con tres o más residuos Cys, la posición de los puentes disulfuro puede determinarse tal como se describe en el texto. (Las abreviaturas de una letra para los aminoácidos se explican en la Tabla 3–1.)

conjunto original de péptidos generados por la tripsina. Por cada puente disulfuro faltarán dos de los péptidos originales, al tiempo que aparecerá un nuevo péptido más grande. Los dos péptidos que han desaparecido representan las regiones del polipéptido intacto que están unidas por el puente disulfuro.

Las secuencias de aminoácidos se pueden deducir también mediante otros métodos

El método esquematizado anteriormente no es la única forma de determinar secuencias de aminoácidos. Nuevos métodos basados en la espectroscopia de masas permiten la secuenciación de polipéptidos cortos (de 20 a 30 residuos aminoácidos) en sólo unos pocos minutos (Recuadro 3–2). Además, el desarrollo de métodos rápidos para la secuenciación de DNA (Capítulo 8), la elucidación del código genético (Capítulo 27) y el desarrollo de técnicas para el aislamiento de genes (Capítulo 9) permiten deducir la secuencia de un polipéptido mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos del gen que lo codifica **(Fig. 3–28)**. Las técnicas utilizadas para determinar secuencias de proteínas y de DNA son complementarias. Cuando se dispone del gen, la secuenciación del DNA puede ser más rápida y más precisa que la secuenciación de la proteína. La mayoría de proteínas se secuencian actualmente por esta vía indirecta. Si no se ha aislado el gen es necesaria la secuenciación directa de los péptidos, y ésta puede proporcionar información (por ejemplo, localización de los puentes disulfuro) que no puede ser aportada por la secuencia de DNA. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos, o incluso de una parte de un polipéptido, puede facilitar mucho el aislamiento del gen correspondiente (Capítulo 9).

Secuencia de aminoácidos (proteína) Gln–Tyr–Pro–Thr–Ile–Trp

Secuencia de DNA (gen) CAGTATCCTACGATTTGG

FIGURA 3–28 Correspondencia entre las secuencias de DNA y aminoácidos. Cada aminoácido está codificado por una secuencia específica de tres nucleótidos en el DNA. El código genético se describe con detalle en el Capítulo 27.

El conjunto de métodos disponible actualmente para analizar tanto las proteínas como los ácidos nucleicos está dando entrada a una nueva disciplina de "bioquímica de la célula completa". La secuencia completa del DNA de un organismo, su genoma, está actualmente disponible para organismos que van desde virus o bacterias a eucariotas multicelulares (véase la Tabla 1–2). Se están descubriendo miles de nuevos genes, entre ellos muchos que codifican proteínas sin ninguna función conocida. Para describir el complemento proteico entero codificado

(continúa en la página 100)

RECUADRO 3–2 MÉTODOS Investigar proteínas mediante la espectrometría de masas

El espectrómetro de masas ha sido desde hace tiempo una herramienta indispensable en química. Las moléculas a analizar, a las que nos referimos como **analitos,** se ionizan en primer lugar en el vacío. Cuando las nuevas moléculas cargadas se introducen en un campo eléctrico y/o magnético, sus trayectorias a través del campo son función de su relación masa-carga, m/z. La medición de esta propiedad de las especies ionizadas puede utilizarse para deducir la masa (M) del analito con una precisión muy elevada.

Aunque la espectroscopia de masas ha venido utilizándose durante muchos años, no podía aplicarse a macromoléculas tales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Las medidas de m/z se realizan sobre moléculas en fase gaseosa, y el calentamiento u otros tratamientos necesarios para llevar una macromolécula a la fase gaseosa causaban normalmente su rápida descomposición. En 1988 se desarrollaron dos técnicas diferentes para superar este problema. En una de ellas, las proteínas se colocan dentro de una matriz que puede absorber luz. Con un pulso corto de luz de láser, las proteínas se ionizan y a continuación se desorben de la matriz hacia el sistema de vacío. Este proceso, conocido como **espectrometría de masas de ionización/desorción por láser asistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)** o **MALDI MS,** se ha utilizado con éxito para medir la masa de una gran variedad de macromoléculas. En un segundo proceso, que da los mismos buenos resultados, las macromoléculas en disolución son forzadas a pasar de la fase líquida a la fase gas directamente. Una disolución de analitos se hace pasar a través de una aguja cargada que se mantiene a un elevado potencial eléctrico, dispersando la disolución en una fina niebla de microgotas cargadas. El disolvente que rodea las macromoléculas se evapora rápidamente y los iones con múltiples cargas resultantes se introducen de esta forma en la fase gas de manera no destructiva. Esta técnica se denomina **espectrometría de masas de ionización por electrospray,** o **ESI MS.** Los protones añadidos durante el paso a través de la aguja proporcionan carga adicional a la macromolécula. La m/z de la molécula puede analizarse en la cámara de vacío.

La espectrometría de masas proporciona una gran cantidad de información para la investigación en proteómica, enzimología y química de proteínas en general. Las técnicas requieren solamente cantidades minúsculas de muestra, de forma que pueden aplicarse fácilmente a las pequeñas cantidades de proteína que pueden extraerse de un gel electroforético bidimensional. La determinación precisa de la masa molecular de una proteína es uno de los parámetros críticos para su identificación. Una vez que se conoce con precisión la masa de una proteína, la espectroscopia de masas es un método conveniente y preciso para detectar cambios de masa debidos a la presencia de cofactores unidos, iones metálicos unidos, modificaciones covalentes, etc.

El proceso para determinar la masa molecular de una proteína mediante ESI MS se ilustra en la Figura 1. Al ser inyectada en la fase gas, una proteína adquiere un número variable de protones, y por tanto de cargas positivas, del disolvente. Esto crea un espectro de especies con diferentes relaciones masa-carga. Cada pico sucesivo corresponde a una especie que se diferencia del pico contiguo por una diferencia de carga de 1 y una diferencia de masa de 1 (1 protón). La masa de la proteína puede determinarse a partir de cualquier par de picos contiguos.

El m/z medido para un pico es

$$(m/z)_2 = \frac{M + n_2X}{n_2}$$

en donde M es la masa de la proteína, n_2 es el número de cargas y X es la masa de los grupos añadidos (en este caso protones). De modo similar, para el pico contiguo,

$$(m/z)_1 = \frac{M + (n_2 + 1)X}{n_2 + 1}$$

Tenemos ahora dos incógnitas (M y n_2) y dos ecuaciones. Podemos resolverlas primero para n_2 y después para M:

$$n_2 = \frac{(m/z)_2 - X}{(m/z)_2 - (m/z)_1}$$

$$M = n_2[(m/z)_2 - X]$$

Este cálculo que utiliza los valores de m/z para cualquier par de picos de un espectro como el que se muestra en la Figura 1b proporcionará normalmente la masa de la proteína (en este caso, aerolisina k; 47.342 Da) con un error de solamente ± 0,01%. Generando varios conjuntos de picos, repitiendo el cálculo y promediando los resultados, se obtiene generalmente un valor de M incluso más preciso. Existen algoritmos de ordenador que transforman el espectro de m/z en un pico único, que proporciona también una medida de la masa muy precisa (Fig. 1b, inserto).

La espectroscopia de masas puede utilizarse también para secuenciar segmentos cortos de un polipéptido, una aplicación que se ha establecido como una herramienta muy valiosa para la identificación rápida de proteínas desconocidas. La información secuencial se extrae utilizando una técnica denominada **MS en tándem**, o **MS/MS**. Una disolución que contiene la proteína que se está investigando se trata en primer lugar con una proteasa o un reactivo químico para reducirla por rotura hidrolítica a una mezcla de péptidos más cortos. La mezcla se inyecta entonces en un dispositivo que consiste esencialmente en dos espectrómetros de masas en tándem (Fig. 2a, arriba). En el primero de ellos se separa la mezcla de péptidos y los fragmentos ionizados se manipulan de forma que sólo uno de los diversos tipos de péptidos producidos por la fragmentación sale por el otro extremo. La muestra del péptido seleccionado, todas las moléculas del cual tienen carga en algún punto de su secuencia, viaja entonces a través de una cámara de vacío entre los dos espectrómetros de masas. En esta cámara de colisión, el péptido vuelve a fragmentarse por impactos de elevada energía con un "gas de colisión", una pequeña cantidad de un gas noble como el helio o argón que se deja entrar en la cámara de vacío. Este procedimiento está diseñado para fragmentar muchas de las moléculas de péptido de la muestra, siendo en promedio cada péptido individual fragmentado sólo en un sitio. La mayor parte de las fragmentaciones se dan en los enlaces peptídicos. Esta fragmentación no implica la adición de agua (se lleva a cabo casi en el vacío), de forma que los productos pueden incluir radicales de iones moleculares tales como radicales carbonilo (Fig. 2a, abajo). La carga del péptido original es retenida por uno de los fragmentos generados a partir de éste.

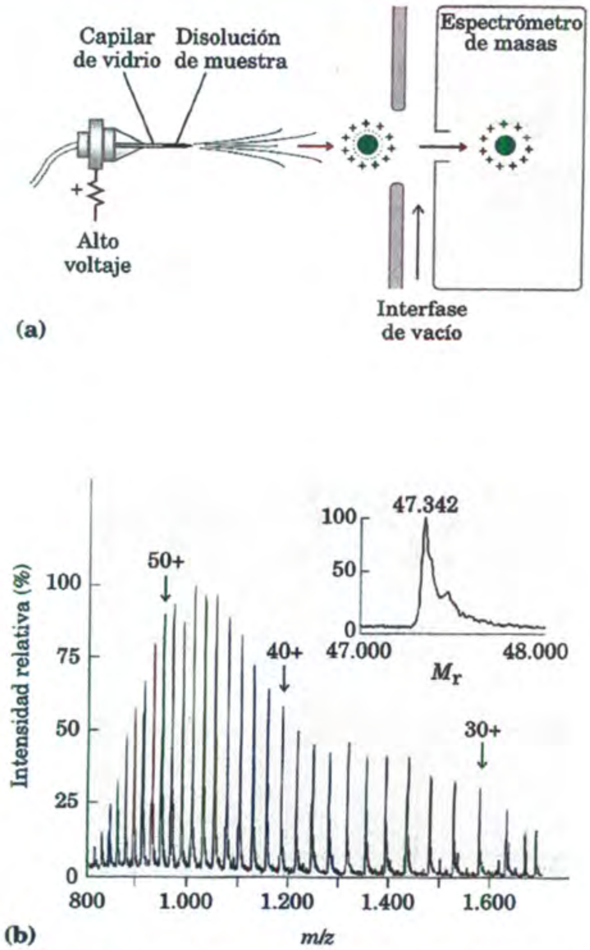


FIGURA 1 Espectro de masas por electrospray de una proteína. (a) Una disolución de proteína se dispersa en microgotas fuertemente cargadas mediante el paso a través de una aguja bajo la influencia de un campo eléctrico de alto voltaje. Las microgotas se evaporan y los iones (en este caso con protones adicionados) entran en el espectrómetro de masas para la medida de m/z. El espectro generado **(b)** es una familia de picos, en la que cada pico sucesivo (de derecha a izquierda) corresponde a una especie cargada aumenta en 1 tanto en masa como en carga. En el inserto se muestra una transformación de este espectro generada por ordenador.

El segundo espectrómetro de masas mide entonces las relaciones m/z de todos los fragmentos cargados (los fragmentos sin carga no se detectan). Esto genera uno o más conjuntos de picos. Uno de los conjuntos de picos (Fig. 2b) consiste en todos los fragmentos cargados que se han generado mediante la rotura del mismo tipo de enlace (pero en puntos diferentes del péptido) y derivan de la rotura del enlace en el mismo lado, ya sea el carboxilo-terminal o bien el amino-terminal. Cada pico sucesivo en un conjunto determinado tiene un aminoácido menos que el pico anterior. La diferencia de masa de pico a pico identifica el aminoácido que se ha perdido en cada caso, revelando así la secuencia del péptido. Las únicas ambigüedades implican la leucina y la isoleucina, que tienen la misma masa.

(*continúa en la página siguiente*)

RECUADRO 3–2 MÉTODOS Investigar proteínas mediante la espectrometría de masas (*continuación de la página anterior*)

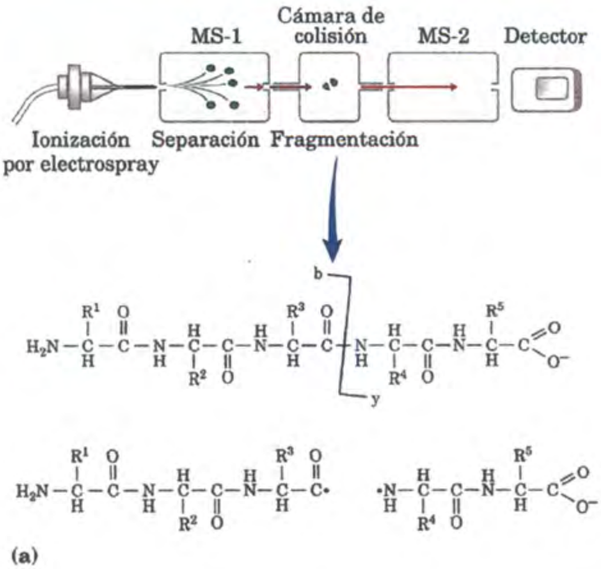
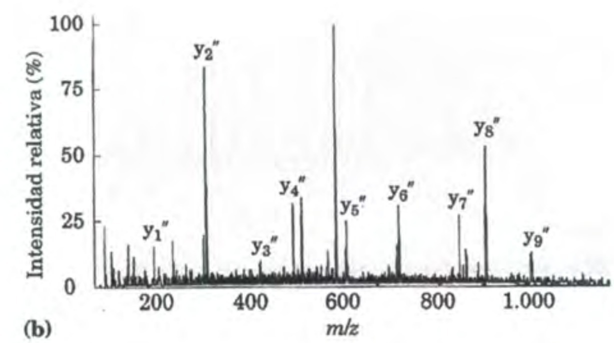


FIGURA 2 Obtención de información secuencial de una proteína por espectrometría de masas en tándem. (a) Tras hidrólisis proteolítica, una disolución de proteína se inyecta en un espectrómetro de masas (MS-1). Los diferentes péptidos se separan de manera que sólo se selecciona uno para su análisis posterior. El péptido seleccionado se fragmenta de nuevo en una cámara entre los dos espectrómetros de masas, y se mide *m/z* para cada fragmento en el segundo espectrómetro de masas (MS-2). Muchos de los iones generados durante esta segunda fragmentación resultan de la rotura del enlace peptídico, en la forma mostrada. Estos iones se denominan iones tipo b o tipo y, en función de si la carga se mantiene en el lado amino o carboxilo terminal, respectivamente. **(b)** Un espectro típico con picos que representan los fragmentos peptídicos generados a partir de una muestra de un péptido pequeño (10 residuos). Los picos marcados son iones tipo y. El pico intenso cercano a y_5'' es un ión con carga doble y no es parte del conjunto y. Los picos sucesivos difieren en la masa de un determinado aminoácido del péptido original. En este caso, la secuencia deducida fue Phe–Pro–Gly–Gln–(Ile/Leu)–Asn–Ala–Asp–(Ile/Leu)–Arg. Obsérvese la ambigüedad entre los residuos de Ile y Leu, puesto que tienen la misma masa molecular. En este ejemplo, el conjunto de picos derivados de iones de tipo y predomina, y como resultado el espectro queda muy simplificado. Esto es debido a que existe un residuo de Arg en el extremo carboxilo terminal del péptido y la mayoría de las cargas positivas quedan retenidas en este residuo.



La carga del péptido puede permanecer en el fragmento carboxilo-terminal o en el amino-terminal, y pueden romperse otros enlaces además de los peptídicos en el proceso de fragmentación, lo que da como resultado que se suelan generar múltiples conjuntos de picos. Los dos conjuntos predominantes consisten en los fragmentos cargados que derivan de la rotura de los enlaces peptídicos. El conjunto de los fragmentos carboxilo-terminales puede distinguirse sin ambigüedad del de los fragmentos amino-terminales. Dado que las roturas de enlace generadas entre los espectrómetros (en la cámara de colisión) no producen grupos carboxilo y amino completos en los puntos de rotura, los únicos grupos α-amino y α-carboxilo intactos en los fragmentos peptídicos son los de los extremos (Fig. 2a). Los dos conjuntos de fragmentos pueden así asignarse gracias a sus pequeñas diferencias de masa resultantes. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de un conjunto puede confirmarse a partir del otro, mejorando así la fiabilidad de la información secuencial obtenida.

Incluso una secuencia corta es a menudo suficiente para permitir la asociación de una proteína con su gen sin ambigüedades, si la secuencia del gen es conocida. La secuenciación mediante espectrometría de masas no puede reemplazar el procedimiento de degradación de Edman para la secuenciación de polipéptidos largos, pero es ideal para la investigación proteómica dirigida a catalogar los cientos de proteínas celulares que pueden separarse en un gel bidimensional.

(*continuación de la página 98*)
por el DNA de un organismo, los investigadores han acuñado el término **proteoma.** Tal como se describe en el Capítulo 9, las nuevas disciplinas de la genómica y la proteómica complementan las investigaciones realizadas sobre el metabolismo celular intermediario y el metabolismo de ácidos nucleicos, generando una visión nueva y más completa de la bioquímica, a nivel celular e incluso a nivel de organismos enteros.

Es posible sintetizar químicamente péptidos y proteínas pequeñas

Muchos péptidos son potencialmente útiles como agentes farmacológicos por lo que su producción es de considerable importancia comercial. Existen tres manera de obtener un péptido: (1) por purificación a partir del tejido, tarea a menudo dificultada por las concentraciones extremadamente pequeñas de algunos péptidos; (2) mediante ingeniería genética (Capítulo 9); o (3) por síntesis química directa. Gracias al desarrollo de técnicas poderosas, la síntesis química directa es actualmente una opción atractiva en muchos casos. Además de las aplicaciones comerciales, la síntesis de secuencias específicas de péptidos provenientes de proteínas más grandes constituye una herramienta cada vez más importante para el estudio de la estructura y función de proteínas.

La complejidad de las proteínas hace que las estrategias sintéticas tradicionales de la química orgánica no sean prácti-

cas para péptidos de más de cuatro o cinco aminoácidos. Uno de los problemas es la dificultad de purificar el producto después de cada paso.

El principal avance en esta tecnología fue protagonizado por R. Bruce Merrifield en 1962. Su innovación consistía en que la síntesis del péptido se llevaba a cabo manteniéndolo unido por un extremo a un soporte sólido. El soporte es un polímero insoluble (resina) contenido dentro de una columna, similar a las utilizadas en los procedimientos cromatográficos. El péptido se construye sobre este soporte, adicionando aminoácido a aminoácido y utilizando un conjunto estándar de reacciones que siguen un ciclo repetitivo **(Fig. 3–29)**. En cada paso sucesivo del ciclo, grupos químicos protectores bloquean las reacciones no deseadas.

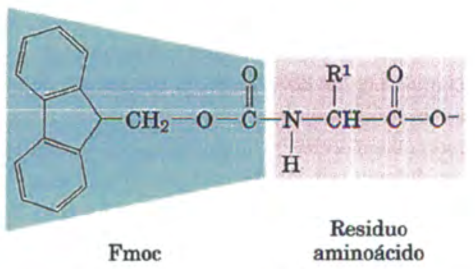
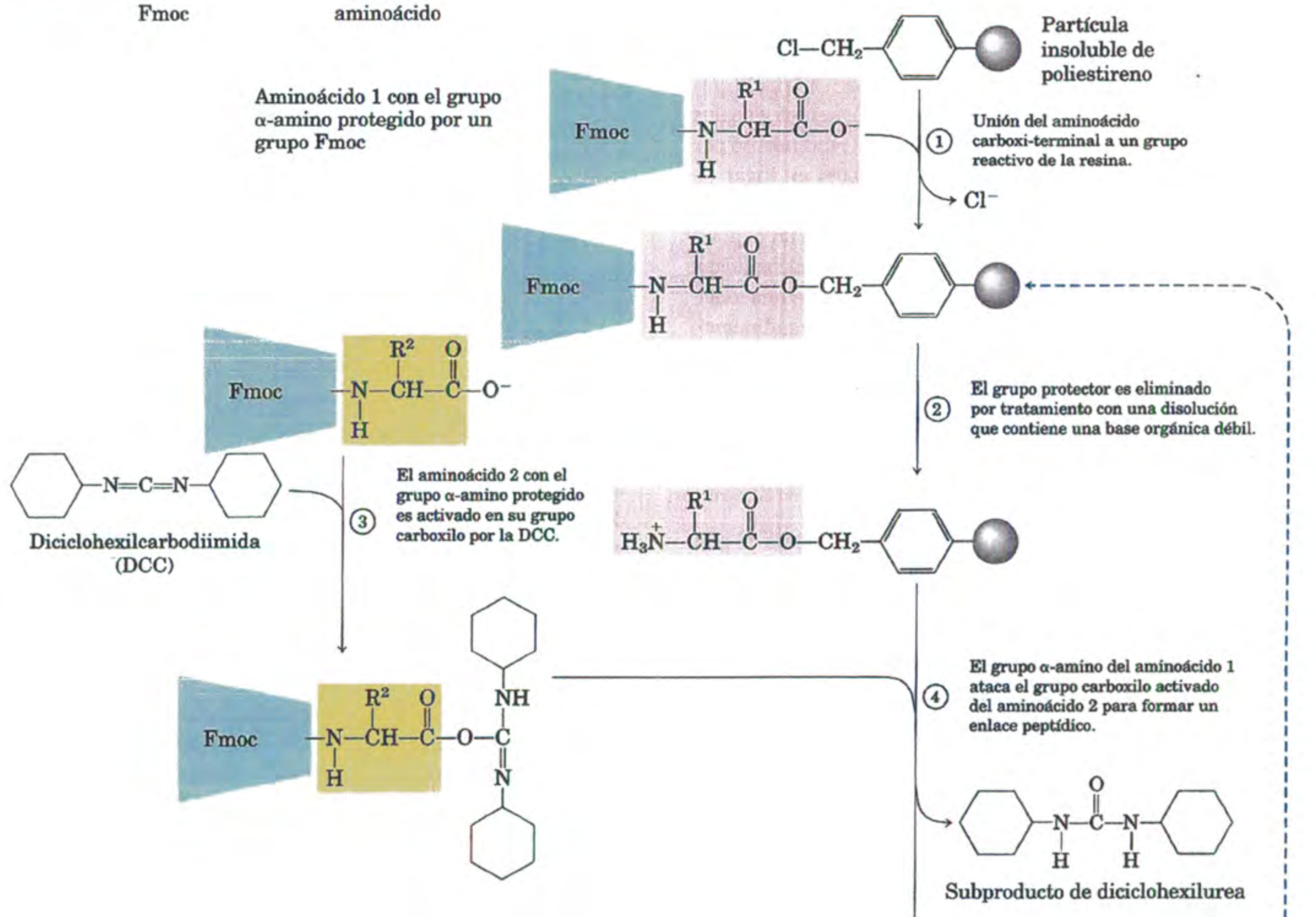
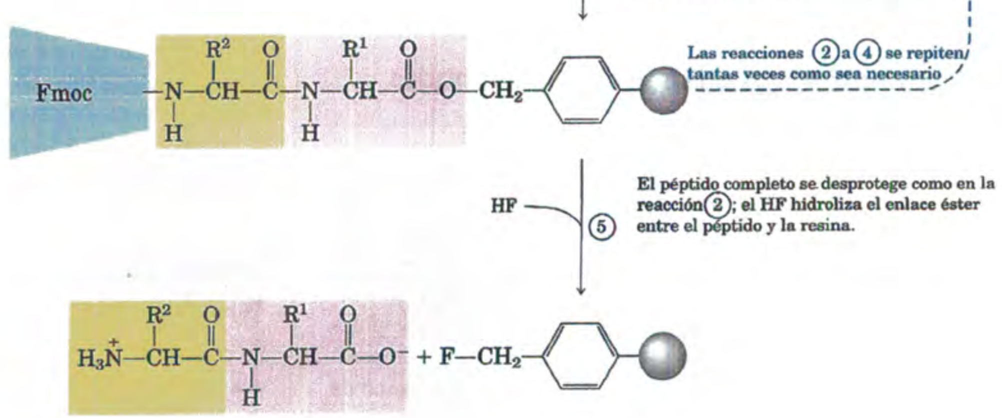


FIGURA 3–29 Síntesis química de un péptido sobre un soporte polimérico insoluble. Las reacciones ① a ④ son necesarias para la formación de cada enlace peptídico. El grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) (sombreado en azul) impide reacciones no deseadas del grupo α-amino del residuo (sombreado en rojo). La síntesis química transcurre desde el extremo carboxilo terminal al extremo amino terminal, la dirección inversa a la dirección de la síntesis proteica in vivo (Capítulo 27).





R. Bruce Merrifield
1921–2006

TABLA 3–8 Efecto del rendimiento de cada paso sobre el global en la síntesis de péptidos

Número de residuos en el polipéptido final	Rendimiento global del péptido final (%) cuando el rendimiento de cada paso es:	
	96,0%	99,8%
11	66	98
21	44	96
31	29	94
51	13	90
100	1,8	82

En la actualidad, la tecnología para la síntesis química de péptidos se ha automatizado. Al igual que en las reacciones de secuenciación consideradas anteriormente, la limitación más importante del proceso estriba en la eficiencia de cada ciclo químico, tal como puede verse al calcular los rendimientos globales de péptidos de diferentes longitudes cuando el rendimiento por adición de cada nuevo aminoácido es de 96,0% en lugar de 99,8 % (Tabla 3–8). La reacción incompleta en un paso puede llevar a la formación de una impureza (en forma de un péptido más corto) en el siguiente. Los procedimientos químicos se han optimizado hasta permitir la síntesis de proteínas de una longitud de 100 aminoácidos en unos pocos días con un rendimiento razonable. Se utiliza un enfoque muy similar en la síntesis de ácidos nucleicos (véase la Fig. 8–35). Merece la pena resaltar que esta tecnología, aún siendo impresionante, empalidece al compararla con los procesos biológicos. La misma proteína de 100 aminoácidos sería sintetizada con una fidelidad exquisita en unos 5 segundos por una célula bacteriana.

Diversos métodos nuevos para la ligación eficiente de péptidos han hecho posible la combinación de péptidos sintéticos para formar proteínas mayores. Con estos métodos pueden crearse nuevas formas de proteínas con grupos químicos en una posición precisa, incluidas aquellas que pueden no encontrarse fácilmente en las proteínas celulares. Estas nuevas formas proporcionan nuevas maneras de ensayar teorías sobre catálisis enzimática, de crear proteínas con nuevas propiedades químicas y de diseñar secuencias proteicas que se plieguen en determinadas estructuras. Esta última aplicación proporciona el test definitivo para nuestra creciente capacidad de relacionar la estructura primaria de un péptido con la estructura tridimensional que adopta en disolución.

La secuencia de aminoácidos proporciona información bioquímica importante

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de una proteína puede proporcionar datos acerca de su estructura tridimensional y función, su localización celular y su evolución. Gran parte de estas deducciones provienen de la búsqueda de similitudes entre una proteína de interés y otras estudiadas previamente. Se conocen miles de secuencias que están disponibles en bancos de datos accesibles a través de Internet. La comparación de una secuencia recién obtenida con el amplio banco de secuencias almacenadas revela a menudo relaciones que pueden ser a la vez sorprendentes e iluminadoras.

No se conoce con detalle el modo en que la secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional, ni puede predecirse siempre la función a partir de la secuencia. Sin embargo existen familias de proteínas que tienen algunas características estructurales y funcionales compartidas que pueden identificarse rápidamente sobre la base de la similitud de las secuencias de aminoácidos. Las proteínas individuales se asignan a las diferentes familias en función del grado de similitud de su secuencia de aminoácidos. Los miembros de una familia son generalmente coincidentes en un 25% o más de sus secuencias, y las proteínas de estas familias suelen compartir, al menos, algunas características estructurales y funcionales. No obstante, algunas familias se definen por identidades que implican solamente a un pequeño número de residuos aminoácidos que son críticos para alguna función. Diversas subestructuras similares o "dominios" (que se definirán en el Capítulo 4) se hallan presentes en muchas proteínas no relacionadas funcionalmente. Estos dominios se pliegan a menudo dando configuraciones estructurales que tienen un grado de estabilidad excepcional o que están especializadas para cierto entorno. De las similitudes estructurales y funcionales dentro de las familias de proteínas es posible deducir también relaciones evolutivas.

Ciertas secuencias de aminoácidos sirven con frecuencia como señales que determinan la localización celular, la modificación química y la vida media de una proteína. Secuencias señal especiales, situadas normalmente en el extremo amino, se utilizan para dirigir ciertas proteínas hacia la exportación extracelular, mientras que otras proteínas son dirigidas para su distribución hacia el núcleo, la superficie celular, el citosol y otras localizaciones celulares. Otras secuencias actúan como sitio de anclaje para grupos prostéticos, tales como los grupos azúcar de las glucoproteínas y los lípidos de las lipoproteínas. Algunas de estas señales están bien caracterizadas y son reconocidas fácilmente si se presentan en la secuencia de una proteína recién descubierta (Capítulo 27).

CONVENCIÓN CLAVE: Gran parte de la información funcional encapsulada en las secuencias proteicas se presenta en la forma de **secuencias consenso.** Este término se aplica a secuencias de RNA, DNA o proteína. Cuando se compara una serie de secuencias de ácido nucleico o de proteína relacionadas, la secuencia consenso es la que contiene la base o el aminoácido más frecuente en cada posición. Aquellas partes de la secuencia en las que se observa una coincidencia particularmente elevada suelen representar dominios funcionales conservados evolutivamente. Se puede usar una amplia gama de herramientas matemáticas disponible en Internet para generar secuencias consenso o para identificarlas en las bases de datos secuenciales. El Recuadro 3–3 ilustra las convenciones más comunes para representar secuencias consenso. ■

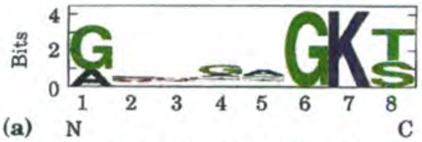
Las secuencias de proteínas permiten deducir la historia de la vida en la Tierra

La gran cantidad de información contenida en la secuencia de una determinada proteína está contenida en la aparentemente

RECUADRO 3–3 Secuencias consenso y logotipos de secuencia

Las secuencias consenso se pueden representar de diferentes maneras. Usaremos los dos ejemplos de secuencias consenso mostradas en la Figura 1 para mostrar dos tipos de convenciones: (a) una estructura de unión a ATP llamada lazo P (véase el Recuadro 12–2) y (b) una estructura de unión a Ca^{2+} llamada mano EF (véase la Fig. 12–11). Las reglas descritas aquí están adaptadas a partir de las utilizadas en la página web de comparación de secuencias PROSITE (expasy.org/prosite), que usan el código de una letra para los aminoácidos.

[AG]-x(4)-G-K-[ST].



(a)

D-{W}-[DNS]-{ILVFYW}-[DENSTG]-[DNQGHRK]-{GP}-[LIVMC]-[DENQSTAGC]-x(2)-[DE]-[LIVMFYW].

(b)

FIGURA 1 Representación de dos secuencias consenso. (a) Lazo P, una estructura de unión a ATP; **(b)** mano EF, una estructura de unión a Ca^{2+}.

En una de las formas de descripción de secuencias consenso (mostrada en la parte superior de (a) y (b)), cada posición se separa de la siguiente mediante un guión. Se escribe una x allí donde cualquier aminoácido es posible. Las ambigüedades se indican listando los aminoácidos aceptables en una posición determinada entre corchetes. Por ejemplo, en (a) [AG] significa Ala o Gly. Si en una posición se permiten todos los aminoácidos excepto unos cuantos, aquellos *no* permitidos se listan entre llaves. Por ejemplo, en (b) {W} significa cualquier aminoácido excepto Trp. La repetición de un elemento de la secuencia se indica escribiendo a continuación de su símbolo el número de repeticiones o su rango entre paréntesis. Por ejemplo, en (a) x(4) indica x–x–x–x, y x(2,4) indica x–x, o x–x–x, o x–x–x–x. Cuando una pauta se restringe a los extremos amino o carboxilo de la secuencia, empieza con < o termina con >, respectivamente (esto no sucede en los ejemplos mostrados aquí). Finalmente, un punto indica el final del patrón. Aplicando todas estas reglas a la secuencia consenso de (a), A o G pueden concentrarse en la primera posición. Las cuatro posiciones siguientes pueden ser ocupadas por cualquier aminoácido, seguidas por las posiciones invariantes G y K. La última posición sólo puede ser S o T.

Los logotipos de secuencia proporcionan una representación más informativa y gráfica de los alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos (o de ácidos nucleicos). Cada logotipo consiste en un apilamiento de símbolos para cada posición de la secuencia. La altura del apilamiento (en bits) indica el grado de conservación de la secuencia en esta posición, mientras que la altura de cada uno de los símbolos indica la frecuencia relativa del aminoácido (o nucleótido). En el caso de las secuencias de aminoácidos, los colores denotan sus características: polares (G, S, T, Y, C, Q, N) en verde; básicos (K, R, H) en azul; acídicos (D, E) en rojo, e hidrofóbicos (A, V, L, I, P, W, F, M) en negro. La clasificación de los aminoácidos en este esquema es ligeramente diferente de los de la Tabla 3–1 y la Figura 3–5. Los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas están incluidos en los grupos de los no polares (F, W) y polares (Y). La glicina, siempre difícil de clasificar, se considera polar. Observe que cuando en una posición puede haber múltiples aminoácidos, raramente aparecen con igual probabilidad y generalmente predominan uno o unos pocos. La representación logotípica clarifica este predominio y la secuencia conservada queda clara. Sin embargo, algunos aminoácidos que pueden estar presentes en una posición quedan oscurecidos, como es el caso de la Cys que puede aparecer ocasionalmente en la posición 8 de la mano EF en (b).

---

simple cadena de letras con la que se simboliza la secuencia. Uno de los principales empeños de los bioquímicos ha sido el desarrollo de métodos cada vez más potentes para la extracción de información a partir del número cada vez mayor de secuencias disponibles. El análisis de la información disponible en las muchas y continuamente crecientes bases de datos, que incluyen secuencias génicas y de proteínas y estructuras macromoleculares, ha dado lugar a la aparición del nuevo campo de la **bioinformática.** Uno de los productos de esta disciplina es el creciente número de programas informáticos, muchos de ellos disponibles fácilmente en Internet, que pueden ser utilizados por cualquier científico, estudiante o persona interesada. Toda función proteica reside en su estructura tridimensional que, a su vez, viene determinada principalmente por su estructura primaria. De este modo, la información deducible de una secuencia proteica sólo está limitada por nuestro grado de comprensión de los principios estructurales y funcionales. La constante evolución de las herramientas bioinformáticas hace posible la identificación de segmentos funcionales en nuevas proteínas y sirve de soporte para el establecimiento de sus relaciones secuenciales y estructurales con proteínas ya presentes en las bases de datos. Desde otra perspectiva, las secuencias de proteínas están empezando a aportar datos acerca de la evolución de las propias proteínas y, en último término, de la evolución de la vida en el planeta.

La paternidad del campo de la evolución molecular se suele adjudicar a Emile Zuckerkandl y Linus Pauling, cuyos trabajos de mediados de la década de 1960 fueron pioneros en el uso de secuencias de nucleótidos y proteínas para el estudio de la evolución. El punto de partida es engañosamente claro y simple: si dos organismos están estrechamente relacionados, las secuencias de sus genes y proteínas serán similares. Las secuencias son cada vez más divergentes al aumentar la distancia evolutiva entre dos organismos. Este punto de vista empezó a dar sus frutos en la década de 1970, cuando Carl Woese utilizó secuencias de RNA ribosómico para definir a las arqueas como un grupo de organismos vivos distintos de las bacterias y de los

eucariotas (véase la Fig. 1–4). Las secuencias de proteínas ofrecen la oportunidad de refinar mucho la información disponible. Gracias a los proyectos genoma que investigan organismos que van desde bacterias a humanos, el número de secuencias disponibles crece a una enorme velocidad. Esta información sirve para seguir la historia biológica. El reto consiste en aprender a leer el jeroglífico genético.

La evolución no ha tomado un camino simple y lineal. En cualquier intento de extraer la información evolutiva contenida en secuencias de proteínas abundan las complejidades. Los residuos aminoácidos esenciales para la actividad de una determinada proteína se conservan a lo largo del tiempo evolutivo. Los residuos menos importantes para la función pueden sufrir ciertas variaciones con el tiempo, es decir, puede haber sustituciones de aminoácidos, y estas variaciones pueden proporcionar la información necesaria para trazar el camino evolutivo. Sin embargo, las sustituciones de aminoácidos no se producen siempre al azar. En ciertas posiciones de la estructura primaria, la necesidad de mantener la función proteica puede implicar que sólo sean tolerables algunas sustituciones particulares de aminoácidos. Algunas proteínas tienen mayor número de residuos aminoácidos variables que otras. Por esta y otras razones, las proteínas pueden evolucionar a velocidades distintas.

Otro factor que complica la deducción de la historia evolutiva es la poco frecuente transferencia de un gen o grupo de genes de un organismo a otro, según un proceso que se denomina **transferencia génica lateral.** Los genes transferidos pueden ser bastante similares a los genes de los que derivaron en los organismos de partida, mientras que la mayor parte de los demás genes de los mismos dos organismos pueden tener relaciones evolutivas muy distantes. Un ejemplo de transferencia génica lateral se encuentra en la reciente extensión rápida de genes de resistencia a los antibióticos entre las poblaciones bacterianas. Las proteínas derivadas de estos genes transferidos no serían buenos candidatos para el estudio de la evolución bacteriana porque sólo comparten una historia evolutiva muy limitada con sus organismos huésped.

El estudio de la evolución molecular suele centrarse generalmente en familias de proteínas estrechamente relacionadas. En la mayoría de los casos, las familias escogidas tienen funciones esenciales en el metabolismo celular que han debido estar presentes en la células viables más primitivas, reduciendo de este modo la posibilidad de que hubieran sido introducidas recientemente por transferencia génica lateral. Por ejemplo, una proteína denominada EF-1α (factor de elongación 1α) está implicada en la síntesis de proteínas en todos los eucariotas. En bacterias se encuentra otra proteína similar, EF-Tu, con la misma función. Las similitudes en secuencia y función indican que EF-1α y EF-Tu son miembros de una familia de proteínas que comparten un ancestro común. Los miembros de las familias de proteínas son **proteínas homólogas** u **homólogos.** Se puede refinar más el concepto de homólogo. Si dos proteínas de una misma familia (es decir, dos homólogos) se encuentran en la misma especie, nos referimos a ellos como **parálogos.** Los homólogos de especies diferentes se denominan **ortólogos.** El proceso de reconstrucción de la evolución implica la previa identificación de familias adecuadas de proteínas homólogas para usarlas a continuación en la reconstrucción de los caminos evolutivos.

Los homólogos se identifican utilizando programas de ordenador cada vez más potentes que son capaces de comparar directamente dos o más secuencias seleccionadas o de buscar en voluminosas bases de datos para encontrar parientes evolutivos de una secuencia proteica seleccionada. El proceso de búsqueda electrónica puede imaginarse como el deslizamiento de una secuencia sobre otra hasta que se encuentra el mejor apareamiento. En el alineamiento secuencial se asigna una valor positivo a cada posición en la que los residuos aminoácidos son idénticos (estos valores varían de un programa a otro), lo que proporciona una medida de la calidad del alineamiento. El procedimiento no está exento de complicaciones. En algunos casos las proteínas comparadas se aparean bien, por ejemplo, en dos segmentos secuenciales, mientras que estos segmentos están conectados por secuencias menos relacionadas y de longitudes diferentes. Por tanto, los dos segmentos coincidentes no pueden ser alineados al mismo tiempo. Para salvar este obstáculo, el programa informático introduce "huecos" en una de las secuencias para volver a colocar los segmentos apareables en registro **(Fig. 3–30)**. Como resulta natural, prácticamente todos los posibles pares de secuencias podrían ser alineados de alguna forma si se introdujera un número de huecos suficiente. Para evitar alineamientos no informativos, los programas incluyen penalizaciones para cada hueco introducido, lo que hace disminuir el valor o la puntuación del alineamiento global. A través de un proceso de prueba y error electrónico el programa selecciona el alineamiento con la puntuación óptima y que maximiza el número de aminoácidos idénticos, al mismo tiempo que minimiza la introducción de huecos.

Los aminoácidos idénticos resultan a menudo inadecuados para la identificación de proteínas relacionadas o, más importante todavía, para determinar cuán cercanas son las proteínas en una escala de tiempo evolutiva. La consideración de las propiedades químicas de los aminoácidos sustituidos permite establecer un análisis más útil. Muchas de las sustituciones de aminoácidos observadas en una familia de proteínas pueden ser de tipo conservador, es decir, aquellas en las que un residuo aminoácido está reemplazado por otro de propiedades químicas similares. Por ejemplo, un residuo de Glu puede sustituir en una proteína a uno de Asp encontrado en otra proteína de la misma familia; los dos aminoácidos están cargados negativamente. Esta sustitución conservadora debe obtener lógicamente una mayor puntuación en el alineamiento final que otra de tipo no conservador, como la sustitución de un residuo Asp por el hidrofóbico de Phe.

```
     E. coli  TGNRTIAVYDLGGGTFDISIIEIDEVDGEKTFEVLATNGDTHLGGEDFDSRLIHYL
B. subtilis  DEDQTILLYDLGGGTFDVSILELGDG    TFEVRSTAGDNRLGGDDFDQVIIDHL
                                       └──┘
                                       Hueco
```

FIGURA 3–30 Alineamiento de secuencias de proteína con el uso de huecos. Se muestra el alineamiento de secuencias de una pequeña parte de las proteínas Hsp70 (una clase muy extendida de chaperonas de plegamiento de proteínas) de dos especies bacterianas bien estudiadas, *E. coli* y *Bacillus subtilis*. La introducción de un hueco en la secuencia de *B. subtilis* permite un mejor alineamiento de los residuos de aminoácido en los dos lados del mismo. Los residuos idénticos están sombreados.

			Secuencia firma	
Arqueas	*Halobacterium halobium*	IGHVDHGKSTMVGR	LLYETGSVPEHV	IEQH
	Sulfolobus solfataricus	IGHVDHGKSTLVGR	LLMDRGFIDEKT	VKEA
Eucariotas	*Saccharomyces cerevisiae*	IGHVDSGKSTTTGH	LIYKCGGIDKRT	IEKF
	Homo sapiens	IGHVDSGKSTTTGH	LIYKCGGIDKRT	IEKF
Bacteria gram-positiva	*Bacillus subtilis*	IGHVDHGKSTMVGR		ITTV
Bacteria gram-negativa	*Escherichia coli*	IGHVDHGKTTLTAA		ITTV

FIGURA 3–31 Secuencia firma de la familia de proteínas EF-1α/EF-Tu. La secuencia firma (encuadrada) es una inserción de 12 aminoácidos cerca del extremo amino-terminal de la secuencia. Los residuos que se alinean bien en las dos secuencias están sombreados en amarillo. Tanto las arqueas como los eucariotas tienen la firma, a pesar de que las secuencias de las inserciones son bastante distintas entre los dos grupos. La variación en la secuencia firma refleja la divergencia evolutiva significativa que ha tenido lugar en este sitio desde que apareció en un primer ancestro de ambos grupos.

En la mayoría de los métodos de búsqueda de homologías y exploración de relaciones evolutivas, las secuencias de proteínas (obtenidas por secuenciación directa de la proteína o por secuenciación del DNA que la codifica) son superiores a las secuencias no génicas de ácidos nucleicos (las que no codifican una proteína o un RNA funcional). Para un ácido nucleico, compuesto de cuatro tipos de residuos diferentes, un alineamiento al azar de secuencias no homólogas dará generalmente coincidencias en al menos un 25% de las posiciones. La introducción de un limitado número de huecos puede aumentar la fracción de residuos coincidentes hasta el 40% o más, con lo que la probabilidad de obtener alineamientos de secuencias no relacionadas aumenta mucho. Los 20 residuos aminoácidos reducen considerablemente la probabilidad de obtener alineamientos no informativos de este tipo.

Los programas usados para la generación de alineamientos secuenciales se complementan con métodos que comprueban la fiabilidad de esos alineamientos. Un ensayo informático habitual consiste en desordenar la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas comparadas con el fin de obtener una secuencia al azar para hacer que a continuación el programa alinee la secuencia así "revuelta" con la otra secuencia no modificada. Se asignan puntuaciones al nuevo alineamiento y se repite el proceso muchas veces. El alineamiento original obtenido antes del desordenamiento de una de las secuencias debería tener una puntuación significativamente mayor que la de cualquiera de los alineamientos hechos con secuencias al azar; con ello, aumenta la confianza de que el alineamiento secuencial haya identificado una pareja de homólogos. Obsérvese que la *ausencia* de una puntuación significativa para un determinado alineamiento no significa necesariamente que no exista una relación evolutiva entre dos proteínas. Como veremos en el Capítulo 4, las similitudes en estructura tridimensional ponen a veces de manifiesto relaciones evolutivas en casos en los que la homología secuencial ha sido borrada con el paso del tiempo.

El empleo de una familia de proteínas para realizar estudios evolutivos requiere la identificación de miembros de esta familia con funciones similares en la gama más amplia posible de organismos. La información extraída de la familia de proteínas puede usarse para seguir la evolución de esos organismos. A partir del análisis de la divergencia genética en familias de proteínas seleccionadas es posible segregar los organismos en clases basadas en su relación evolutiva. Esta información debe ser comparable a la obtenida a partir de los exámenes clásicos sobre la fisiología y la bioquímica de estos organismos.

Es posible encontrar ciertos segmentos de la secuencia de una proteína en organismos de un grupo taxonómico y no en otros grupos; estos segmentos pueden usarse como **secuencia firma** del grupo en el que se encuentren. Un ejemplo de secuencia firma consiste en la inserción de 12 aminoácidos cerca del extremo *N*-terminal en las proteínas EF-1α/EF-Tu en todas las arqueas y eucariotas pero no en bacterias **(Fig. 3–31)**. Esta firma particular es una de las muchas pruebas bioquímicas que pueden ayudar en el establecimiento de las relaciones evolutivas de eucariotas y arqueas. Otras secuencias firma permiten el establecimiento de relaciones evolutivas entre grupos de organismos en muchos niveles taxonómicos diferentes.

Tomando en consideración la totalidad de la secuencia de una proteína, se pueden ahora construir árboles evolutivos más elaborados y que incluyan muchas especies en cada grupo taxonómico. La **Figura 3–32** presenta un árbol de este tipo para bacterias, basado en la divergencia secuencial de la proteína GroEL (presente en todas las bacterias y que asiste en el proceso de plegamiento proteico). El árbol puede refinarse en base a las secuencias de múltiples proteínas y mediante la adición de datos sobre propiedades bioquímicas y fisiológicas únicas de cada especie. Existe un gran número de métodos para la generación de árboles, cada uno de ellos con sus ventajas e inconvenientes, y muchas maneras de representar las relaciones evolutivas resultantes. En la Figura 3–32 los puntos finales libres de las líneas reciben el nombre de "nodos externos"; cada uno de ellos representa una especie existente, escrita a continuación. Los puntos de intersección de dos líneas, los "nodos internos" representan especies ancestrales extinguidas. En la mayor parte de representaciones (incluida la Figura 3–32), las longitudes de las líneas que conectan los nodos son proporcionales al número de sustituciones de aminoácidos que separan una especie de otra. Si podemos relacionar dos especies existentes con un nodo interno común (que representa el ancestro común de las dos especies), la longitud de la rama que conecta el nodo externo con el interno representa el número de sustituciones de aminoácidos que separa cada una de las especies existentes de su ancestro. La suma de las longitudes de los segmentos que conectan una especie existente con otra a través de un ancestro común refleja el número de sustituciones que separa las dos especies. El árbol debe calibrarse a través de la comparación con informaciones sobre el registro fósil y otras fuentes con el fin de determinar el tiempo necesario para la divergencia de las diferentes especies.

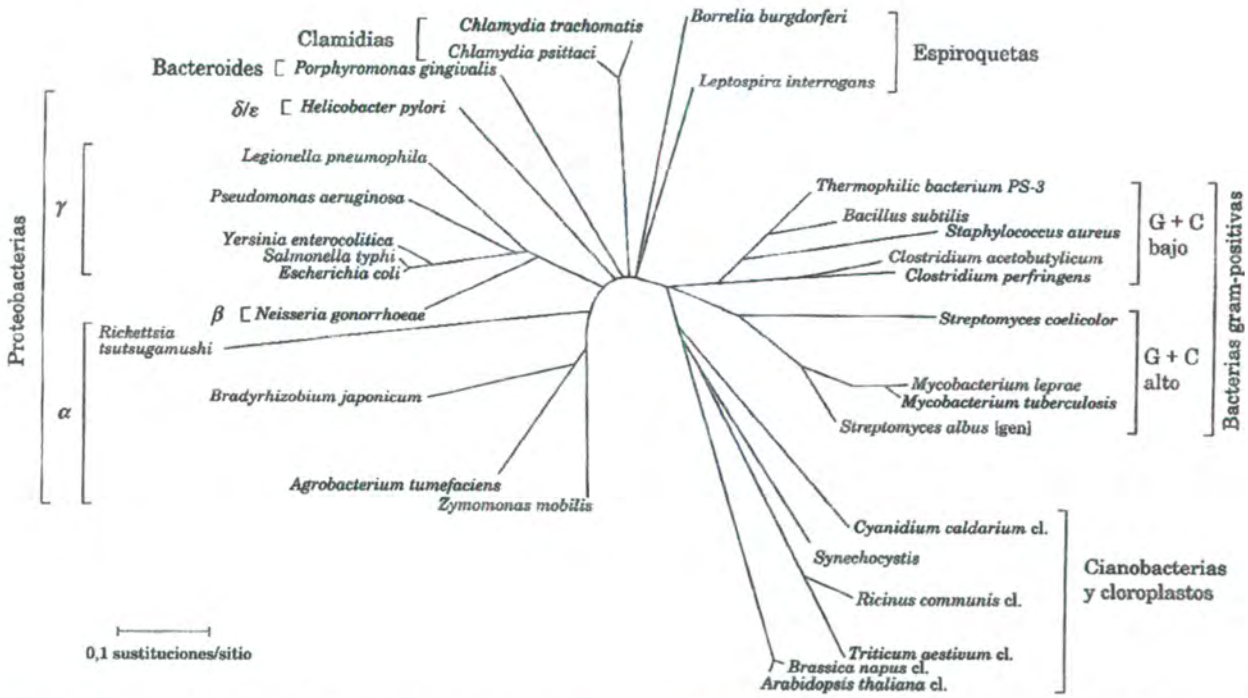


FIGURA 3–32 Árbol evolutivo derivado de comparaciones de secuencias de aminoácidos. Un árbol evolutivo bacteriano, basado en la divergencia secuencial observada en la familia de proteínas GroEL. En el árbol también se incluyen los cloroplastos (cl., abajo a la derecha) de algunas especies no bacterianas.

Al ir disponiendo progresivamente de mayor información secuencial en las bases de datos podemos generar árboles evolutivos basados en múltiples proteínas. Estos árboles se van refinando con la nueva información genómica generada por el uso de métodos de análisis cada vez más sofisticados. Estos trabajos nos conducen al objetivo de construir un árbol de la vida suficientemente detallado como para ser capaz de describir la evolución y las relaciones de cada organismo presente en la Tierra. Por supuesto, éste es un proceso en marcha **(Fig. 3–33)**. En él, las preguntas que se formulan son fundamentales para definir la forma en que los seres humanos se contemplan a sí mismos y al mundo que los rodea. El campo de la evolución molecular promete convertirse en una de las fronteras científicas más vibrantes del siglo XXI.

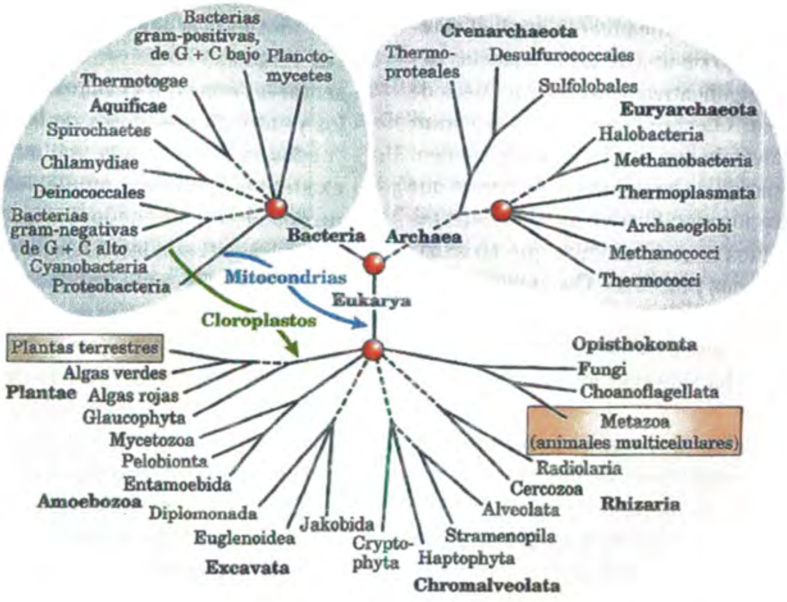


FIGURA 3–33 Árbol de la vida consenso. El árbol que se muestra aquí se basa en el análisis de muchas proteínas diferentes y de características genómicas adicionales. Las ramas mostradas como líneas discontinuas todavía se están investigando. El árbol presenta sólo una parte de la información disponible, así como sólo una fracción de las incógnitas todavía por resolver. Cada grupo existente que se muestra representa una historia evolutiva compleja por sí mismo.

RESUMEN 3.4 Estructura de las proteínas: estructura primaria

- Las diferencias en la función proteica son el resultado de diferencias en la secuencia y en la composición de aminoácidos. Para una determinada proteína se permiten algunas variaciones en la secuencia sin que la función se vea afectada.
- Las secuencias de aminoácidos se deducen a partir de la fragmentación de los polipéptidos en péptidos más pequeños mediante el uso de reactivos específicos para cierto tipo de enlaces peptídicos, seguida por la determinación de la secuencia de cada fragmento mediante degradación automática de Edman y por la ordenación de la secuencia final mediante la localización de zonas de solapamiento entre fragmentos generados por diferentes reactivos. También es posible deducir la secuencia de las proteínas a partir de la secuencia de nucleótidos de su gen correspondiente en el DNA.
- Es posible sintetizar químicamente péptidos y proteínas pequeñas (de hasta 100 residuos). El péptido se construye, residuo a residuo, mientras permanece unido a un soporte sólido.
- Las secuencias de proteínas constituyen una rica fuente de información sobre la estructura y función de proteínas, así como sobre la evolución de la vida sobre la Tierra. Se están desarrollando métodos sofisticados para trazar la evolución mediante el análisis de los lentos cambios que se producen en la secuencias de aminoácidos de proteínas homólogas.

Palabras clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

aminoácidos 72
grupo R 72
centro quiral 72
enantiómeros 73
configuración absoluta 74
sistema D, L 74
polaridad 74
absorbancia, *A* 76
zwitterion 78
pH isoeléctrico (punto isoeléctrico, pI) 80
péptido 82
proteína 82
enlace peptídico 82
oligopéptido 82
polipéptido 82
proteína oligomérica 84
protómero 84
proteína conjugada 84
grupo prostético 84
extracto crudo 85
fracción 85
fraccionamiento 85
diálisis 85
cromatografía en columna 85
cromatografía de intercambio iónico 86
cromatografía de filtración en gel 87
cromatografía de afinidad 88
cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 88
electroforesis 88
dodecil sulfato sódico (SDS) 89
enfoque isoeléctrico 90
estructura primaria 92
estructura secundaria 92
estructura terciaria 92
estructura cuaternaria 92
degradación de Edman 95
proteasas 95
proteoma 100
secuencia consenso 102
bioinformática 103
transferencia génica lateral 104
proteínas homólogas 104
homólogo 104
parálogo 104
ortólogo 104
secuencia firma 105

Bibliografía

Aminoácidos

Dougherty, D.A. (2000) Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 645–652.

Greenstein, J.P. & Winitz, M. (1961) *Chemistry of the Amino Acids*, 3 Vols, John Wiley & Sons, New York.

Kreil, G. (1997) D-Amino acids in animal peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 337–345.

Detalles sobre la presencia de estos estereoisómeros no usuales de los aminoácidos.

Meister, A. (1965) *Biochemistry of the Amino Acids*, 2nd edn, Vols 1 and 2, Academic Press, Inc., New York.

Tratado enciclopédico de las propiedades, presencia natural y metabolismo de los aminoácidos.

Péptidos y proteínas

Creighton, T.E. (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Una fuente de uso general y muy útil.

Trabajar con proteínas

Dunn, M.J. & Corbett, J.M. (1996) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **271**, 177–203.

Descripción detallada de la tecnología.

Kornberg, A. (1990) Why purify enzymes? *Methods Enzymol.* **182**, 1–5.

El papel crítico de los métodos bioquímicos clásicos en una nueva era.

Scopes, R.K. (1994) *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd edn, Springer-Verlag, New York.

Una buena fuente para descripciones más completas de los principios subyacentes en los métodos cromatográficos y otros métodos.

Estructura primaria de proteínas y evolución

Andersson, L., Blomberg, L., Flegel, M., Lepsa, L., Nilsson, B., & Verlander, M. (2000) Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers* **55**, 227–250.

Discusión sobre los métodos usados para la fabricación de péptidos con propiedades farmacéuticas.

Dell, A. & Morris, H.R. (2001) Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science* **291**, 2351–2356.

Las glucoproteínas pueden ser complejas; la espectrometría de masas es el método más adecuado para analizarlas.

Delsuc, F., Brinkmann, H., & Philippe H. (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 361–375.

Gogarten, J.P. & Townsend, J.P. (2005) Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 679–687.

Gygi, S.P. & Aebersold, R. (2000) Mass spectrometry and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 489–494.

Uso de la espectrometría de masas para la identificación y el estudio de proteínas celulares.

Koonin, E.V., Tatusov, R.L., & Galperin, M.Y. (1998) Beyond complete genomes: from sequence to structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 355–363.

Buena discusión sobre los posibles usos de la enorme cantidad de información que se está acumulando sobre secuencias proteicas.

Li, W.-H. & Graur, D. (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2nd edn, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

Texto de fácil lectura en el que se describen las metodologías usadas en el análisis de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos. El Capítulo 5 proporciona una de las mejores descripciones disponibles sobre la construcción de árboles evolutivos a partir de datos secuenciales.

Mann, M. & Wilm, M. (1995) Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 219–224.

Un resumen de esta técnica abordable para principiantes.

Mayo, K.H. (2000) Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: for the love of basics or just for the technology of it. *Trends Biotechnol.* **18**, 212–217.

Miranda, L.P. & Alewood, P.F. (2000) Challenges for protein chemical synthesis in the 21st century: bridging genomics and proteomics. *Biopolymers* **55**, 217–226.

Este artículo y el anterior de Mayo, 2000 (anterior) describen cómo sintetizar péptidos y combinarlos con el fin de disponer de herramientas para estudiar un gran número de problemas bioquímicos.

Rokas, A., Williams, B.L., King, N., & Carroll, S.B. (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425**, 798–804.

Manera en que la comparación de secuencias de múltiples proteínas puede generar información evolutiva precisa.

Sanger, F. (1988) Sequences, sequences, sequences. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 1–28.

Ameno relato histórico sobre el desarrollo de los métodos de secuenciación.

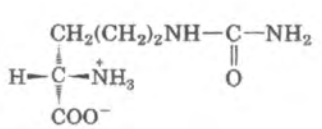
Snel, B., Huynen, M.A., & Dutilh B.E. (2005) Genome trees and the nature of genome evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 191–209.

Zuckerkandl, E. & Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **8**, 357–366.

Considerado por muchos el artículo fundacional en el campo de la evolución molecular.

Problemas

1. Configuración absoluta de la citrulina La citrulina aislada de la sandía tiene la estructura que se muestra a continuación. ¿Es un aminoácido D o L? Explique por qué.



2. Relación entre la curva de titulación y las propiedades ácido-base de la glicina Una disolución de 100 mL de glicina 0,1 M a pH 1,72 se tituló con una disolución de NaOH 2 M. Se registró el pH y los resultados se representaron como se muestra en la siguiente gráfica. Los puntos clave de la titulación se señalan como I a V. Para cada una de las afirmaciones siguientes, (a) a (o) *identifique* el punto clave adecuado de la titulación y *justifique* su elección.

(a) La glicina está presente predominantemente en la forma $^+H_3N—CH_2—COOH$.

(b) La carga neta *media* de la glicina es $+\frac{1}{2}$.

(c) La mitad de los grupos amino están ionizados.

(d) El pH es igual al pK_a del grupo carboxilo.

(e) El pH es igual al pK_a del grupo amino protonado.

(f) La glicina tiene su máxima capacidad tamponante.

(g) La carga neta *media* de la glicina es igual a cero.

(h) El grupo carboxilo ha sido completamente titulado (primer punto de equivalencia).

(i) La glicina está totalmente titulada (segundo punto de equivalencia).

(j) La especie predominante es $^+H_3N—CH_2—COO^-$.

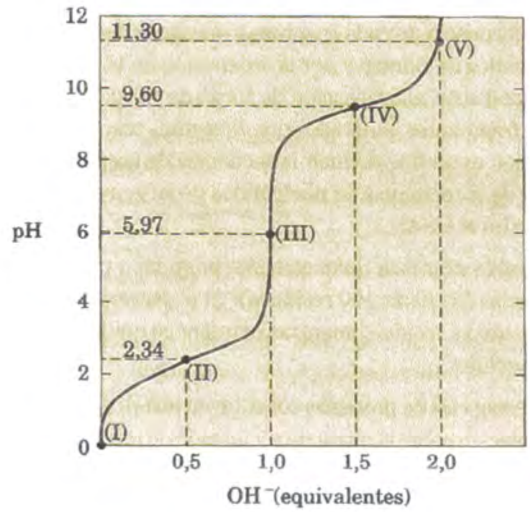
(k) La carga neta *media* de la glicina es –1.

(l) La glicina está presente predominantemente como una mezcla 50:50 de $^+H_3N—CH_2—COOH$ y $^+H_3N—CH_2—COO^-$.

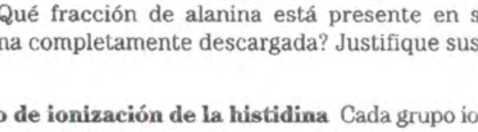
(m) Corresponde al punto isoeléctrico.

(n) Corresponde al final de la titulación.

(o) Representan las *peores* regiones de pH en cuanto al poder tamponante.



3. ¿Cuánta alanina está presente como especie completamente sin carga? A un pH igual a su punto isoeléctrico, la carga *neta* de la alanina es cero. Se pueden dibujar dos estructuras con una carga neta de cero, pero la forma predominante de la alanina a su pI es zwitteriónica.



Zwitteriónica Sin carga

(a) ¿Por qué la alanina es predominantemente zwitteriónica y no está completamente descargada en su pI?

(b) ¿Qué fracción de alanina está presente en su pI como forma completamente descargada? Justifique sus respuestas.

4. Estado de ionización de la histidina Cada grupo ionizable de un aminoácido puede existir en uno de dos estados posibles, cargado o neutro. La carga eléctrica del grupo funcional viene determinada por la relación entre su pK_a y el pH de la solución. Esta relación viene descrita por la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

(a) La histidina tiene tres grupos funcionales ionizables. Escriba las ecuaciones de equilibrio para sus tres ionizaciones y asigne el pK_a adecuado de cada ionización. Dibuje las estructuras de la histidina en cada estado de ionización. ¿Cuál es la carga neta de la molécula de histidina en cada estado de ionización?

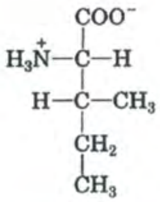
(b) Dibuje las estructuras de los estados de ionización de la histidina predominantes a pH 1, 4, 8 y 12. Observe que el estado de ionización puede ser obtenido aproximadamente tratando independientemente cada grupo ionizable.

(c) ¿Cuál es la carga neta de la histidina a pH 1, 4, 8 y 12? Cuando se coloca en un campo eléctrico a cada uno de estos valores de pH, ¿se desplazará la histidina hacia el ánodo (+) o hacia el cátodo (−)?

5. Separación de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico El análisis de mezclas de aminoácidos empieza separando la mezcla en sus componentes mediante cromatografía de intercambio iónico. En una columna con una resina de intercambio catiónico que contiene grupos sulfonato ($—SO_3^-$) (véase la Fig. 3–17a) los aminoácidos fluyen a diferente velocidad debido a dos factores que influyen en su movimiento: (1) la atracción iónica entre los residuos sulfonato de la columna y grupos funcionales cargados positivamente en los aminoácidos y (2) las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los aminoácidos y el esqueleto fuertemente hidrofóbico de la resina de poliestireno. Para cada par de aminoácidos señalados, determine cuál eluirá antes en una columna de intercambio catiónico con un tampón a pH 7,0.

(a) Asp y Lys
(b) Arg y Met
(c) Glu y Val
(d) Gly y Leu
(e) Ser y Ala

6. Nomenclatura de estereoisómeros de la isoleucina La estructura del aminoácido isoleucina es:



(a) ¿Cuántos centros quirales tiene?
(b) ¿Cuántos isómeros ópticos?
(c) Dibuje fórmulas de perspectiva de todos los isómeros ópticos de la isoleucina.

7. Comparación de los valores de pK_a de la alanina y polialanina La curva de titulación de la alanina muestra la ionización de dos grupos funcionales con valores de pK_a de 2,34 y 9,69, correspondientes a la ionización de los grupos carboxilo y amino protonado, respectivamente. La titulación de di-, tri- y oligopéptidos mayores de la alanina también muestra la ionización de sólo dos grupos funcionales, aunque los valores experimentales de pK_a son diferentes. La tendencia de los valores de pK_a se resume en la tabla.

Aminoácido o péptido	pK_1	pK_2
Ala	2,34	9,69
Ala–Ala	3,12	8,30
Ala–Ala–Ala	3,39	8,03
Ala–(Ala)$_n$–Ala, $n \geq 4$	3,42	7,94

(a) Dibuje la estructura de Ala–Ala–Ala. Identifique los grupos funcionales asociados con pK_1 y pK_2.
(b) ¿Por qué *aumenta* el valor de pK_1 a cada adición de un residuo Ala al oligopéptido de Ala?
(c) ¿Por qué *disminuye* el valor de pK_2 a cada adición de un residuo Ala al oligopéptido de Ala?

8. Tamaño de las proteínas.¿Cuál es la masa molecular aproximada de una proteína de 682 residuos aminoácidos en una única cadena polipeptídica?

9. Número de residuos de triptófano en la albúmina de suero bovino Un análisis cuantitativo de aminoácidos indica que la albúmina de suero bovino (BSA) contiene 0,58% en peso de triptófano (M_r 204).

(a) Calcule la masa molecular *mínima* de la BSA (es decir, suponiendo que haya un solo residuo de triptófano por molécula de proteína).
(b) La filtración en gel de la BSA da una estimación de masa molecular de unos 70.000. ¿Cuántos residuos de triptófano hay en una molécula de albúmina de suero?

10. Composición de subunidades de una proteína Una proteína tiene una masa molecular de 400 kDa medida por filtración en gel. Si se analiza mediante electroforesis en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS), la proteína muestra tres bandas de masas moleculares 180, 160 y 60 kDa. Cuando la electroforesis se realiza en presencia de SDS y ditiotreitol se observan otras tres bandas de masa moleculares 160, 90 y 60 kDa. Determine la composición subunitaria de la proteína.

11. Carga eléctrica neta de los péptidos Un péptido tiene la secuencia

Glu–His–Trp–Ser–Gly–Leu–Arg–Pro–Gly

(a) ¿Cuál es la carga neta de la molécula a pH 3, 8 y 11? (Utilice los valores de pK_a para las cadenas laterales y grupos amino y carboxilo-terminales dados en la Tabla 3–1.)
(b) Estime el pI de este péptido.

12. Punto isoeléctrico de la pepsina Se da el nombre de pepsina a varios enzimas digestivos secretados (en forma de proteínas precursoras mayores) por las glándulas que recubren el estómago. Estas glándulas secretan también ácido clorhídrico, que disuelve la materia en forma de partículas de la comida, permitiendo que la pepsina corte enzimáticamente moléculas individuales de proteína. La mezcla resultante de comida, HCl y enzimas digestivos se denomina quimo y tiene un pH cercano a 1,5. ¿Qué pI predeciría para las proteínas de tipo pepsina? ¿Qué grupos funcionales han de estar presentes para proporcionar este pI a la pepsina? ¿Qué aminoácidos pueden aportar tales grupos a las proteínas?

13. Punto isoeléctrico de las histonas Las histonas son proteínas que se encuentran en el núcleo de las células eucarióticas, fuertemente unidas al DNA, el cual tiene muchos grupos fosfato. El pI de las histonas es muy elevado, alrededor de 10,8. ¿Qué aminoácidos deben estar presentes en número relativamente elevado en las histonas? ¿En qué forma contribuyen estos residuos a la fuerte unión entre las histonas y el DNA?

14. Solubilidad de los polipéptidos Un método utilizado en la separación de polipéptidos se basa en sus solubilidades diferenciales. La solubilidad en agua de los polipéptidos grandes depende de la polaridad relativa de sus grupos R, especialmente del número de grupos ionizados: cuantos más grupos ionizados haya más soluble será el polipéptido. De los pares de polipéptidos siguientes, ¿cuál es más soluble al pH indicado?

(a) $(Gly)_{20}$ o $(Glu)_{20}$ a pH 7,0
(b) $(Lys\text{–}Ala)_3$ o $(Phe\text{–}Met)_3$ a pH 7,0
(c) $(Ala\text{–}Ser\text{–}Gly)_5$ o $(Asn\text{–}Ser\text{–}His)_5$ a pH 6,0
(d) $(Ala\text{–}Asp\text{–}Gly)_5$ o $(Asn\text{–}Ser\text{–}His)_5$ a pH 3,0

15. Purificación de un enzima Un bioquímico descubre y purifica un enzima nuevo generando la siguiente tabla de purificación:

Procedimiento	Proteína total (mg)	Actividad (unidades)
1. Extracto crudo	20.000	4.000.000
2. Precipitación (sal)	5.000	3.000.000
3. Precipitación (pH)	4.000	1.000.000
4. Cromatografía de intercambio iónico	200	800.000
5. Cromatografía de afinidad	50	750.000
6. Cromatografía de exclusión molecular	45	675.000

(a) A partir de la información dada en la tabla, calcule la actividad específica de la solución enzimática después de cada procedimiento de purificación.

(b) ¿Cuál de los procedimientos de purificación utilizados con este enzima es el más efectivo (es decir, produce el máximo incremento relativo en pureza)?

(c) ¿Cuál de los procedimientos de purificación es el menos efectivo?

(d) ¿Hay alguna indicación basada en los resultados de esta tabla de que el enzima tras el paso 6 sea ya puro? ¿Qué más se podría hacer para evaluar la pureza de la preparación enzimática?

16. Diálisis Una proteína purificada se encuentra en un tampón Hepes (*N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfónico) a pH 7 con NaCl 500 mM. Una muestra (1 mL) de la disolución de proteína se coloca en un tubo hecho con una membrana de diálisis y se dializa frente a 1 L del mismo tampón Hepes con 0 mM de NaCl. Las moléculas e iones pequeños (como Na^+, Cl^- y Hepes) pueden difundir a través de la membrana de diálisis, pero la proteína no.

(a) Al llegar la diálisis al equilibrio, ¿cuál es la concentración de NaCl en la muestra de proteína? Asuma que no se producen variaciones de volumen durante la diálisis.

(b) Si la muestra original de 1 mL se dializara dos veces sucesivas frente a 100 mL del mismo tampón Hepes con 0 mM de NaCl, ¿cuál sería la concentración final de NaCl en la muestra?

17. Purificación de péptidos A pH 7,0, ¿cuál sería el orden de elución de los tres péptidos siguientes de una columna llena de polímero intercambiador de cationes? Sus composiciones de aminoácidos son:

Proteína A: Ala 10%, Glu 5%, Ser 5%, Leu 10%, Arg 10%, His 5%, Ile 10%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 10%, Gly 10%, Pro 5% y Trp 10%.

Proteína B: Ala 5%, Val 5%, Gly 10%, Asp 5%, Leu 5%, Arg 5%, Ile 5%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 5%, Trp 5%, Ser 5%, Thr 5%, Glu 5%, Asn 5%, Pro 10%, Met 5% y Cys 5%.

Proteína C: Ala 10%, Glu 10%, Gly 5%, Leu 5%, Asp 10%, Arg 5%, Met 5%, Cys 5%, Tyr 5%, Phe 5%, His 5%, Val 5%, Pro 5%, Thr 5%, Ser 5%, Asn 5% y Gln 5%.

18. Determinación de la secuencia del péptido cerebral leucina-encefalina A partir de tejido cerebral normal se ha aislado un grupo de péptidos que influyen sobre la transmisión nerviosa en ciertas partes del cerebro. Estos péptidos se conocen como opioides debido a que se fijan a receptores que se unen también a drogas opiáceas, tales como la morfina o la naloxona. De este modo los opioides imitan algunas de las propiedades de los opiáceos. Algunos investigadores consideran que estos péptidos son los inhibidores del dolor propios del cerebro. Utilizando la información que se da a continuación, determine la secuencia de aminoácidos del opioide leucina-encefalina. Explique por qué su estructura está de acuerdo con todos los datos aportados.

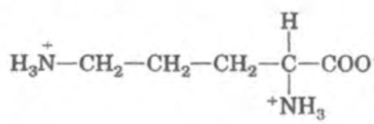
(a) La hidrólisis completa por HCl 6M a 110 °C seguida de análisis de aminoácidos indica la presencia de Gly, Leu, Phe y Tyr en una proporción molar 2:1:1:1.

(b) El tratamiento del péptido con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno seguido por hidrólisis completa y cromatografía indicó la presencia del 2,4-dinitrofenil derivado de la tirosina. No se encontró tirosina libre.

(c) La digestión completa del péptido con quimotripsina seguido de cromatografía dio lugar a tirosina y leucina libres, más un tripéptido que contenía Phe y Gly en una proporción 1:2.

19. Estructura de un antibiótico peptídico de *Bacillus brevis* Los extractos de la bacteria *Bacillus brevis* contienen un péptido con propiedades antibióticas. Este péptido forma complejos con iones metálicos y, aparentemente, interfiere en el transporte iónico a través de las membranas celulares de otras especies bacterianas, matándolas. La estructura de este péptido se ha determinado a partir de las siguientes observaciones.

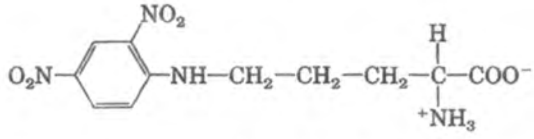
(a) La hidrólisis ácida completa del péptido seguida de análisis de aminoácidos produce cantidades equimoleculares de Leu, Orn, Phe, Pro y Val. Orn es ornitina, un aminoácido que no se halla presente en las proteínas pero que se encuentra en algunos péptidos. Tiene la estructura



(b) La masa molecular del péptido se calculó en alrededor de 1.200.

(c) Cuando se trató con el enzima carboxipeptidasa el péptido no experimentó hidrólisis alguna. Este enzima cataliza la hidrólisis del residuo carboxilo terminal de un polipéptido a menos que el residuo sea Pro o no contenga un grupo carboxilo libre por alguna razón.

(d) El tratamiento del péptido intacto con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno, seguido de hidrólisis completa y cromatografía, dio sólo aminoácidos libres y el siguiente derivado:



(Sugerencia: observe que el 2,4-dinitroferlil derivado implica el grupo amino de una cadena lateral y no el grupo α-amino.)

(e) La hidrólisis parcial del péptido seguida de separación cromatográfica y análisis de secuencia dio lugar a los di- y tripéptidos siguientes (el aminoácido amino-terminal siempre se encuentra a la izquierda):

Leu–Phe Phe–Pro Orn–Leu Val–Orn

Val–Orn–Leu Phe–Pro–Val Pro–Val–Orn

Dada la información anterior, deduzca la secuencia de aminoácidos del antibiótico peptídico. Exponga sus razonamientos. Cuando haya llegado a una estructura, demuestre que es coherente con *cada una* de las observaciones experimentales.

20. Eficiencia de la secuenciación de péptidos Un péptido con la estructura primaria Lys–Arg–Pro–Leu–Ile–Asp–Gly–Ala

se secuencia por el procedimiento de Edman. Si cada ciclo de Edman tuviera una eficiencia del 96%, ¿qué porcentaje de los aminoácidos liberados en el cuarto ciclo sería leucina? Haga el cálculo de nuevo, asumiendo en esta ocasión una eficiencia del 99% para cada ciclo.

21. Comparación de secuencias Las proteínas denominadas chaperonas moleculares (descritas en el Capítulo 4) ayudan en el proceso de plegamiento de las proteínas. Una clase de chaperonas presente desde bacterias a mamíferos es la proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Todas la chaperonas Hsp90 contienen una "secuencia firma" de 10 aminoácidos que permite su rápida identificación en las bases de datos secuenciales. A continuación se muestran dos representaciones de esta secuencia firma:

Y-x-[NQHD]-[KHR]-[DE]-[IVA]-F-[LM]-R-[ED].

(a) ¿Qué aminoácidos son invariantes (conservados en todas las especies) en esta secuencia?

(b) ¿En qué posición(es) está la naturaleza del aminoácido limitada a los de cadena lateral con carga positiva? ¿Qué aminoácido se encuentra con más frecuencia en cada posición?

(c) ¿En qué posiciones se restringen las sustituciones a los aminoácidos con cadena lateral de carga negativa? ¿Qué aminoácido predomina en cada posición?

(d) En una de las posiciones puede haber cualquier aminoácido, aunque uno de ellos aparece con mucha mayor frecuencia que los demás. ¿Qué posición es ésta y cuál es el aminoácido que aparece más a menudo?

22. Protocolos de bioquímica: su primera purificación de proteína Siendo el estudiante más nuevo y menos experimentado de un laboratorio de investigación bioquímica, pasa sus primeras semanas lavando material de vidrio y etiquetando tubos de ensayo. A continuación se gradúa para preparar tampones y disoluciones madre para su utilización en diversos procedimientos de laboratorio. Finalmente, le dan la responsabilidad de purificar una proteína. Se trata de un enzima del ciclo del ácido cítrico (que se describe en el Capítulo 16), la citrato sintasa, localizada en la matriz mitocondrial. Siguiendo un protocolo de purificación, lleva a cabo los pasos que se explican a continuación. A lo largo del trabajo, un estudiante con más experiencia le pregunta acerca de la base de cada procedimiento. Dele las respuestas. (Sugerencia: lea en el Capítulo 2 información sobre la osmolaridad; lea en la p. 7 información sobre la separación de orgánulos de células.)

(a) Recoge 20 kg de corazones de buey de un matadero cercano (las células musculares son ricas en mitocondrias que proporcionan energía para la contracción del músculo). Transporta los corazones en hielo y realiza todos los pasos de la purificación en una cámara fría o sobre hielo. Homogena el tejido de los corazones de buey con un triturador de alta velocidad en un medio que contiene sacarosa 0,2 M, tamponado a pH 7,2. *¿Por qué utiliza tejido de corazón de buey, y en tan gran cantidad? ¿Cuál es el propósito de mantener el tejido frío y suspenderlo en sacarosa 0,2 M, a pH 7,2? ¿Qué le pasa al tejido al homogenarlo?*

(b) Somete el homogenado de corazón resultante, que es denso y opaco, a una serie de pasos de centrifugación diferencial. *¿Qué consigue con esto?*

(c) Prosigue con la purificación utilizando la fracción del sobrenadante que contiene mayoritariamente mitocondrias intactas. A continuación lisa osmóticamente las mitocondrias. El lisado, que es menos denso que el homogenado pero aún opaco, consiste principalmente en membranas mitocondriales y el contenido interno de las mitocondrias. Añade sulfato amónico, una sal muy soluble, al lisado a una concentración determinada. Centrifuga la disolución, decanta el sobrenadante, y descarta el pellet. Añade *más* sulfato amónico al sobrenadante, que es más transparente que el lisado. Centrifuga una vez más la muestra, pero esta vez se queda con el pellet, puesto que contiene la proteína de interés. *¿Cuál es la lógica que aconseja la adición de sal en dos pasos?*

(d) Solubiliza el pellet de sulfato amónico que contiene las proteínas mitocondriales y dializa a lo largo de una noche frente a volúmenes grandes de una disolución tamponada (pH 7,2). *¿Por qué no se incluye sulfato amónico en el tampón de diálisis? ¿Por qué utiliza disolución tamponada en lugar de agua?*

(e) Pasa la disolución dializada a través de una columna de cromatografía de exclusión molecular. Siguiendo el protocolo, recoge la *primera* fracción de proteína que sale de la columna, y descarta el resto de fracciones que eluyen de la columna posteriormente. Detecta la proteína midiendo la absorción en el UV (a 280 nm) de las fracciones. *¿Qué le dice sobre la proteína el hecho de recoger la primera fracción? ¿Por qué es la absorción en el UV a 280 nm una buena forma de medir la presencia de proteína en las fracciones eluidas?*

(f) Coloca la fracción recogida en (e) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico. Después de descartar la fracción inicial que sale de la columna, añade una disolución de lavado de pH mayor a la columna y recoge la fracción que eluye inmediatamente. *Explique lo que está haciendo.*

(g) Analiza una pequeña muestra de su fracción, que ahora tiene un volumen muy reducido y es bastante transparente (aunque teñida de rosa), en un gel de isoelectroenfoque. Cuando se tiñe, el gel muestra tres bandas finas. De acuerdo con el protocolo, la proteína de interés es la que tiene un pI de 5,6, pero decide realizar otro ensayo de la pureza de la proteína. Corta la banda de pI 5,6 y la somete a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. La proteína se resuelve como una única banda. *¿Por qué no estaba seguro de la pureza de la banda de proteína "única" en su gel de isoelectroenfoque? ¿Qué le dicen los resultados del gel de SDS? ¿Por qué es importante realizar la electroforesis en gel de SDS* después *del electroenfoque?*

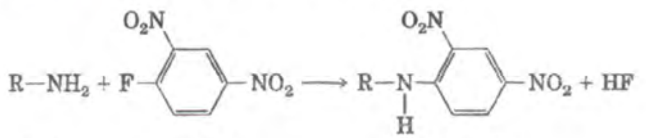
Problema de análisis de datos

23. Determinación de la secuencia de aminoácidos de la insulina. La Figura 3–24 muestra la secuencia de aminoácidos de la hormona insulina. Esta estructura fue determinada por Frederick Sanger y colaboradores. La mayor parte de su trabajo se describe en una serie de artículos publicados en *Biochemical Journal* entre 1945 y 1955.

Cuando Sanger y sus colegas comenzaron su trabajo en 1945 se sabía que la insulina era una proteína pequeña consistente en dos o cuatro cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro. Sanger y sus colaboradores habían desarrollado una serie de métodos simples para secuenciar proteínas.

Tratamiento con FDNB. El FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno) reaccionaba con los grupos amino libres (pero no con

los grupos amido o guanidino) de las proteínas produciendo derivados dinitrofenilo (DNP) de los aminoácidos:



Amino FDNB DNP-amina

Hidrólisis ácida. Hirviendo una proteína durante varias horas en HCl al 10% se hidrolizaban todos sus enlaces peptídicos y amida. Tratamientos más cortos generaban polipéptidos cortos; cuanto más largo era el tratamiento, más completa era la hidrólisis de la proteína en sus aminoácidos.

Oxidación de las cisteínas. El tratamiento de una proteína con ácido perfórmico rompía todos los enlaces disulfuro y convertía todos los residuos Cys en ácido cisteico (Fig. 3–26).

Cromatografía en papel. Esta versión primitiva de la cromatografía en capa fina (véase la Fig. 10–24) separaba compuestos en base a sus propiedades químicas, permitiendo la identificación de aminoácidos individuales y, en ocasiones, de dipéptidos. La cromatografía en capa fina separa también péptidos más grandes.

Como se describe en su primer artículo (1945) Sanger hizo reaccionar insulina con FDNB e hidrolizó la proteína resultante. Encontró muchos aminoácidos libres pero sólo tres DNP-aminoácidos: α-DNP-glicina (con el grupo DNP unido al grupo α-amino); α-DNP-fenilalanina; y ϵ-DNP-lisina (con el grupo DNP unido al grupo ϵ-amino). De estos resultados Sanger dedujo que la insulina constaba de dos cadenas de proteína: una con Gly y otra con Phe en el extremo amino-terminal. Una de las dos cadenas contenía también un residuo Lys, pero no en su extremo amino. A la cadena que empezaba con Gly la llamó "A" y a la que empezaba con Phe la llamó "B".

(a) Explique cómo justifican los experimentos de Sanger sus conclusiones.

(b) ¿Son estos resultados consistentes con la estructura conocida de la insulina (Fig. 3–24)?

En un artículo posterior (1949), Sanger describió el modo en que utilizó estas técnicas para determinar los primeros aminoácidos (el extremo amino-terminal) de cada cadena de insulina. Por ejemplo, para analizar la cadena B, llevó a cabo los pasos siguientes:

1. Oxidó la insulina para separar las cadenas A y B.
2. Preparó una muestra de cadena B pura por cromatografía en papel.
3. Hizo reaccionar la cadena B con FDNB.
4. Hidrolizó la proteína suavemente en medio ácido para producir algunos péptidos más cortos.
5. Separó los DNP-péptidos de los que no contenían grupos DNP.
6. Aisló cuatro de los péptidos DNP, que recibieron los nombres B1 a B4.
7. Llevó a cabo una hidrólisis fuerte de cada DNP-péptido para obtener aminoácidos libres.
8. Identificó los aminoácidos de cada péptido mediante cromatografía en papel.

Obtuvo los resultados siguientes:

B1: solamente α-DNP-fenilalanina
B2: α-DNP-fenilalanina; valina
B3: ácido aspártico; α-DNP-fenilalanina; valina
B4: ácido aspártico; ácido glutámico; α-DNP-fenilalanina; valina

(c) En base a estos datos, ¿cuáles son los primeros cuatro aminoácidos de la cadena B (el extremo amino-terminal)? Explique su razonamiento.

(d) ¿Coincide el resultado con la secuencia conocida de la insulina (Figura 3–24)? Explique las discrepancias si las hay.

Sanger y sus colaboradores usaron éstos y otros métodos relacionados para determinar la secuencia completa de las cadenas A y B. Su secuencia para la cadena A era como sigue (extremo amino a la izquierda):

1 5 10
Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–
15 20
Cys–Ser–Leu–Tyr–Glx–Leu–Glx–Asx–Tyr–Cys–Asx

Al haberse convertido todos los residuos Asn a Asp y todos los residuos Gln a Glu a causa de la hidrólisis ácida hubo que designar a estos residuos como Asx y Glx, respectivamente (no se conocía su exacta identidad en el péptido). Sanger solucionó este problema usando enzimas proteolíticos que rompen enlaces peptídicos, pero no los enlaces amida de Asn y Gln, para preparar péptidos más cortos. A continuación determinó el número de grupos amino presente en cada péptido cuantificando el NH_4^+ liberado cuando el péptido era sometido a hidrólisis ácida. A continuación se muestran algunos de los resultados para la cadena A. Es posible que los péptidos no fueran completamente puros por lo que los números eran aproximados, aunque suficientemente buenos para el propósito de Sanger.

Nombre del péptido	Secuencia del péptido	Número de grupos amino en el péptido
Ac1	Cys–Asx	0,7
Ap15	Tyr–Glx–Leu	0,98
Ap14	Tyr–Glx–Leu–Glx	1,06
Ap3	Asx–Tyr–Cys–Asx	2,10
Ap1	Glx–Asx–Tyr–Cys–Asx	1,94
Ap5pa1	Gly–Ile–Val–Glx	0,15
Ap5	Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–Cys–Ser–Leu	1,16

(e) En base a estos datos, determine la secuencia de aminoácidos de la cadena A. Explique cómo obtuvo su respuesta. Compárela con la Figura 3–24.

Referencias

Sanger, F. (1945) The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* **39**, 507–515.

Sanger, F. (1949) The terminal peptides of insulin. *Biochem. J.* **45**, 563–574.

4

> Posiblemente, las características más notables de [la mioglobina] sean su complejidad y su ausencia de simetría. Su disposición en el espacio parece carecer casi completamente de cualquiera de las regularidades que uno podría imaginar instintivamente, y resulta más complicada de lo predicho por cualquiera de las teorías sobre estructura de proteínas.
>
> —*John Kendrew, artículo en* Nature, *1958*

Estructura tridimensional de las proteínas

El esqueleto covalente de una proteína típica se compone de centenares de enlaces individuales. Dado que es posible la rotación libre alrededor de muchos de estos enlaces, las proteínas pueden adoptar un número muy grande de conformaciones. Sin embargo, cada proteína tiene una función química o estructural específica, lo que sugiere fuertemente que cada proteína posee una estructura tridimensional única **(Fig. 4–1)**. A finales de la década de 1920 se habían cristalizado varias proteínas, entre ellas la hemoglobina (M_r 64.500) y el enzima ureasa (M_r 483.000). Dado que en general la ordenación de las moléculas en un cristal sólo se puede dar cuando las unidades moleculares que componen el cristal son idénticas, el hecho de que muchas proteínas puedan cristalizar es una prueba muy importante de que incluso las proteínas muy grandes son entidades químicas discretas con estructura única. Esta conclusión revolucionó el pensamiento vigente acerca de las proteínas y sus funciones.

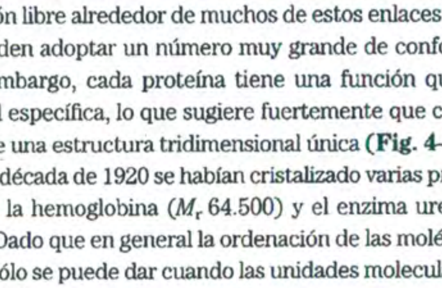


FIGURA 4–1 Estructura del enzima quimotripsina, una proteína globular. Se muestra una molécula de glicina (azul) para la comparación de tamaños. Las estructuras tridimensionales conocidas de proteínas se almacenan en el Protein Data Bank o PDB (véase el Recuadro 4–4). La imagen que se muestra aquí se elaboró utilizando el archivo 6GCH del PDB.

En este capítulo exploraremos la forma en que la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica da lugar a la estructura tridimensional específica de una proteína. Pondremos énfasis en cinco temas. En primer lugar, la estructura tridimensional de una proteína viene determinada por su secuencia de aminoácidos. En segundo lugar, la función de una proteína depende de su estructura. En tercer lugar, una proteína aislada adopta generalmente una única forma estructural o un pequeño número de ellas. En cuarto lugar, las fuerzas más importantes que estabilizan la estructura específica de una proteína son interacciones no covalentes. Por último, dentro del gran número de estructuras proteicas únicas, es posible reconocer algunos patrones estructurales comunes que nos ayudan a organizar nuestro conocimiento sobre la arquitectura de las proteínas.

Estos temas no deben entenderse en el sentido de que las proteínas tengan estructuras tridimensionales estáticas e invariables. La función de una proteína a menudo implica una interconversión entre dos o más formas estructurales. En los Capítulos 5 y 6 se abordarán los aspectos dinámicos de la estructura de las proteínas. La comprensión de todos los niveles estructurales de las proteínas es esencial para la discusión sobre la función de capítulos posteriores.

4.1 Visión general sobre la estructura proteica

Se denomina **conformación** a la disposición espacial de los átomos de una proteína. La posibles conformaciones de una proteína incluyen cualquier estado estructural que pueda lograrse sin romper enlaces covalentes. Un cambio de conformación puede ser, por ejemplo, el resultado de la rotación alrededor de enlaces sencillos. De entre las numerosas conformaciones teóricamente posibles para una proteína que contiene cientos de enlaces sencillos, hay una o, más generalmente, unas pocas que predominan en condiciones biológicas. La necesidad de la existencia de

múltiples conformaciones estables refleja los cambios que deben producirse en la mayor parte de proteínas cuando se unen a otras moléculas o catalizan reacciones. Las conformaciones existentes en unas condiciones determinadas son generalmente las más estables termodinámicamente y que poseen, por tanto, la menor energía libre de Gibbs (G). Las proteínas que se encuentran en cualquiera de sus conformaciones funcionales y plegadas se denominan proteínas **nativas.**

¿Qué principios determinan cuáles son las conformaciones más estables de una proteína? El conocimiento de la conformación de una proteína puede construirse paso a paso a partir de la discusión sobre la estructura primaria en el Capítulo 3 y mediante la consideración de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria. A este enfoque tradicional se debe añadir un nuevo énfasis sobre patrones de plegamiento comunes y clasificables, denominados estructuras supersecundarias o motivos, que proporcionan un adecuado contexto organizativo a este esfuerzo complejo. Empezaremos por establecer algunos principios indicadores.

La conformación de una proteína está estabilizada principalmente por interacciones débiles

En el contexto de la estructura de proteínas, el término **estabilidad** se puede definir como la tendencia a mantener la conformación nativa. Las proteínas nativas sólo son marginalmente estables. La ΔG entre los estados plegado y desplegado de proteínas típicas en condiciones fisiológicas se encuentra en un intervalo de tan sólo 20 a 65 kJ/mol. Una cadena polipeptídica determinada puede adoptar teóricamente incontables conformaciones diferentes, lo que hace que su estado desplegado se caracterice por un alto valor de la entropía conformacional. Este valor de la entropía, junto con las interacciones por enlace de hidrógeno de muchos grupos de la cadena polipeptídica con el disolvente (agua), tiende a favorecer el mantenimiento del estado desplegado. Entre las interacciones químicas que contrarrestan estos efectos y estabilizan la conformación nativa se cuentan los enlaces disulfuro (covalentes) y las interacciones débiles (no covalentes) descritas en el Capítulo 2: enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas.

Muchas proteínas carecen de enlaces disulfuro. El medio intracelular es, en la mayoría de casos, muy reductor, lo que evita la formación de enlaces —S—S—. En eucariotas, los enlaces disulfuro se encuentran principalmente en las proteínas secretadas extracelularmente (por ejemplo, en la hormona insulina). Los enlaces disulfuro son también escasos en proteínas bacterianas. Sin embargo, las bacterias termofílicas, así como las arqueas, suelen tener muchas proteínas con enlaces disulfuro estabilizantes, lo que probablemente constituye un adaptación a la vida a temperaturas elevadas.

Para las proteínas intracelulares de la mayoría de organismos, las interacciones débiles son de especial importancia para el plegamiento de las cadenas polipeptídicas en sus estructuras secundaria y terciaria. La asociación de múltiples polipéptidos para la formación de estructuras cuaternarias también depende de estas interacciones débiles.

La rotura de un solo enlace covalente requiere cerca de 200 a 460 kJ/mol, mientras que las interacciones débiles pueden romperse con simplemente 4 a 30 kJ/mol. Los enlaces covalentes individuales, tales como los enlaces disulfuro que unen partes separadas de una única cadena polipeptídica, son claramente mucho más fuertes que las interacciones débiles individuales. Sin embargo, al ser tan numerosas, las interacciones débiles son las que predominan como fuerza estabilizante de la estructura de las proteínas. En general, la conformación proteica de menor energía libre (es decir, la más estable) es aquella que posee el mayor número de interacciones débiles.

La estabilidad de una proteína no es únicamente el resultado de la suma de las energías libres de formación de las muchas interacciones débiles dentro de ella. Por cada uno de los enlaces de hidrógeno formado en una cadena polipeptídica durante el plegamiento, se debe romper otro enlace de hidrógeno (de energía similar) entre el mismo grupo y el agua. La contribución en estabilidad neta de un enlace de hidrógeno, o la *diferencia* de energía libre entre el estado plegado y el desplegado, puede ser cercana a cero. Las interacciones iónicas pueden ser estabilizantes o desestabilizantes. Debemos buscar, pues, otras explicaciones para saber por qué una conformación nativa determinada de una proteína se encuentra favorecida.

Al examinar cuidadosamente la contribución de las interacciones débiles a la estabilidad de las proteínas, observamos que suelen predominar las **interacciones hidrofóbicas.** El agua pura contiene una red de moléculas de H_2O unidas por puentes de hidrógeno. Ninguna otra molécula tiene el potencial de formación de enlaces hidrógeno del agua, y otras moléculas presentes en una disolución acuosa rompen los enlaces de hidrógeno del agua. Cuando el agua rodea una molécula hidrofóbica, la optimización de los enlaces de hidrógeno da como resultado la formación de una **capa de solvatación** de agua altamente estructurada en la inmediata proximidad de la molécula (véase la Fig. 2–7). El incremento del orden de las moléculas de agua en la capa de solvatación tiene como consecuencia un descenso desfavorable en la entropía del agua. Sin embargo, cuando los grupos hidrofóbicos se agrupan se reduce esta capa de solvatación al no ofrecer cada uno de los grupos su entera superficie a la disolución. Como resultado de ello se produce un aumento favorable de la entropía. Tal como se decía en el Capítulo 2, este aumento de la entropía es la principal fuerza termodinámica que promueve la asociación de grupos hidrofóbicos en disolución acuosa. Por esta razón, las cadenas laterales hidrofóbicas de los aminoácidos tienden a empaquetarse en el interior de la proteína, evitando su interacción con el agua.

En condiciones fisiológicas la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas en una proteína son también procesos dirigidos en gran medida por el mismo efecto entrópico. Los grupos polares pueden formar normalmente enlaces de hidrógeno con el agua y son, por tanto, solubles en ella. Sin embargo, el número de enlaces de hidrógeno por unidad de masa es generalmente mayor en el agua pura que en cualquier otro líquido o disolución, por lo que existen límites a la solubilidad de incluso las moléculas más polares, a causa de la disminución neta de enlaces de hidrógeno por unidad de masa que se produce cuando están presentes. En consecuencia, y hasta cierto punto, también se formará una capa de solvatación de agua estructurada alrededor de las moléculas polares. A pesar de que la energía de formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre dos grupos polares de una macromolécula se compensa en gran parte por la eliminación de las interacciones entre estos mismos grupos y el agua, la liberación de agua estructurada en forma de

interacciones intramoleculares proporciona una fuerza entrópica impulsora del plegamiento. La mayor parte de la variación neta de energía libre que se produce al formarse interacciones débiles en el interior de las proteínas es, por tanto, una consecuencia del aumento en entropía en la disolución acuosa circundante debido a la interiorización de superficies hidrofóbicas. Esto contrarresta de forma más que suficiente la gran pérdida de entropía conformacional del polipéptido constreñido en su conformación plegada.

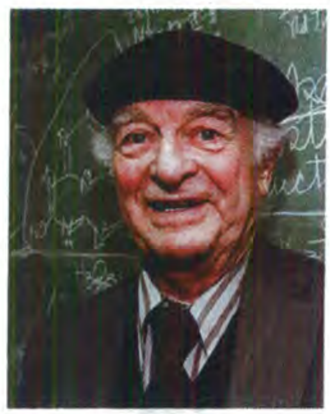
Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel especialmente importante en la estabilización de la conformación de las proteínas; el interior de una proteína es generalmente un núcleo densamente empaquetado de cadenas laterales hidrofóbicas de aminoácidos. También es importante que cualquier grupo polar o cargado situado en el interior de la proteína tenga cerca otros grupos adecuados para el establecimiento de enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas. La contribución de un enlace de hidrógeno a la estabilidad de la estructura nativa parece pequeña, pero la presencia de grupos con potencial de formación de puente de hidrógeno o de grupos cargados sin la pareja adecuada en el interior hidrofóbico de la proteína puede ser tan *desestabilizante* que las conformaciones que los contienen son a menudo imposibles de adoptar termodinámicamente. El cambio favorable de energía libre debido a la combinación de varios de estos grupos con otros de la disolución externa puede ser mayor que la diferencia de energía libre entre los estados plegado y desplegado. Además, los enlaces de hidrógeno entre grupos de la proteína se forman cooperativamente (la formación de un enlace de hidrógeno facilita la formación de los siguientes) en estructuras secundarias repetitivas que optimizan el uso de los enlaces de hidrógeno, como veremos más adelante. De este modo, los enlaces de hidrógeno desempeñan a menudo un importante papel en la conducción del proceso de plegamiento.

La interacción entre grupos de carga opuesta que forman un par iónico, o puente salino, puede tener efectos estabilizantes o desestabilizantes sobre la estructura proteica. Al igual que sucede con los enlaces de hidrógeno, las cadenas laterales de los aminoácidos cargados interaccionan con el agua y las sales cuando la proteína está desplegada, por lo que la pérdida de estas interacciones debe considerarse al evaluar el efecto de un puente salino sobre la estabilidad global de una proteína plegada. Sin embargo, la fuerza de un puente salino incrementa al desplazarse hacia un entorno con menor constante dieléctrica, ε (véase la pág. 46): desde el disolvente polar acuoso (ε cercana a 80) hasta el interior no polar de la proteína (ε cercana a 4). Por tanto, los puentes salinos, en especial aquellos que están parcial o completamente ocultos en el interior, pueden aportar una estabilización significativa a la estructura proteica. Ello explica el incremento en el número de puentes salinos interiorizados en las proteínas de organismos termofílicos. Las interacciones iónicas también limitan la flexibilidad estructural, confiriendo a la estructura proteica una individualidad que no pueden proporcionar las interacciones hidrofóbicas no específicas.

La mayor parte de los modelos estructurales esbozados a lo largo de este capítulo son reflejo de dos reglas simples: (1) los residuos hidrofóbicos se encuentran mayoritariamente sepultados en el interior de la proteína, lejos del contacto con el agua, y (2) se forma el mayor número posible de enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas dentro de la proteína, lo que reduce el número de grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno y de grupos iónicos no apareados con un grupo adecuado. Las proteínas insolubles y las que se localizan en membranas (analizadas en el Capítulo 11) siguen reglas ligeramente diferentes a causa de la función que realizan o del entorno en el que se encuentran, pero las interacciones débiles son también en estos casos elementos estructurales de importancia crítica.

El enlace peptídico es plano y rígido

Arquitectura de proteínas—Estructura primaria Los enlaces covalentes también imponen límites importantes a las posibles conformaciones de un polipéptido. A finales de la década de 1930, Linus Pauling y Robert Corey iniciaron una serie de estudios que sentaron las bases de nuestros conocimientos actuales sobre la estructura proteica. Empezaron con un análisis cuidadoso del enlace peptídico.

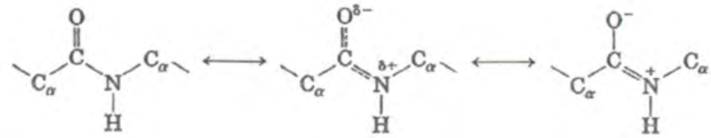


Linus Pauling, 1901–1994

Robert Corey, 1897–1971

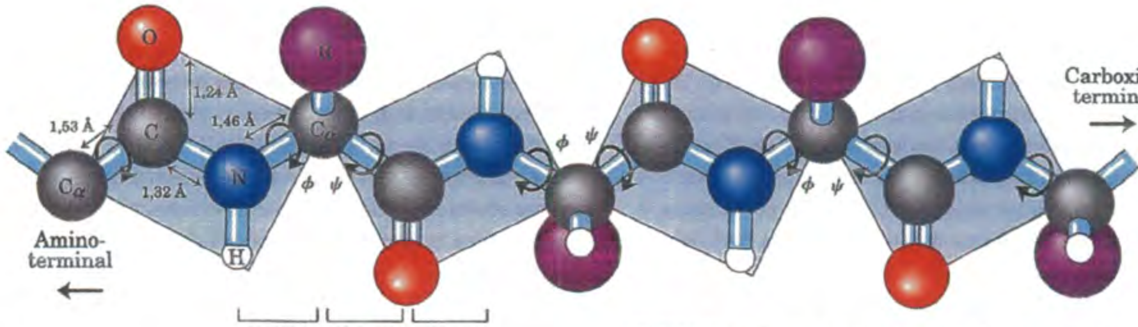
Los carbonos α de aminoácidos adyacentes se encuentran separados por tres enlaces covalentes, ordenados así; C_α—C—N—C_α. Los estudios de difracción de rayos X de cristales de aminoácidos y de dipéptidos y tripéptidos sencillos demostraron que el enlace peptídico C—N es ligeramente más corto que el enlace C—N de una amina simple y que los átomos asociados con el enlace son coplanares. Esto indicaba la existencia de una resonancia, es decir, que el oxígeno carbonílico y el nitrógeno amida compartían parcialmente dos pares de electrones **(Fig. 4–2a)**. El oxígeno tiene una carga negativa parcial y el nitrógeno una carga positiva parcial, formando un pequeño dipolo eléctrico. Los seis átomos del **grupo peptídico** se encuentran en el mismo plano, con el átomo de oxígeno del grupo carbonílico en posición trans respecto al átomo de hidrógeno del nitrógeno amídico. A partir de estos descubrimientos, Pauling y Corey dedujeron que los enlaces peptídicos C—N no pueden girar libremente a causa de su carácter parcial de doble enlace. La rotación es posible alrededor de los enlaces N—C_α y C_α—C. El esqueleto polipeptídico de una proteína puede visualizarse por tanto como una serie de planos rígidos en la que los planos consecutivos comparten un punto común de giro alrededor de C_α (Fig. 4–2b). La rigidez de los enlaces peptídicos limita el número de conformaciones que puede adoptar una cadena polipeptídica.

La conformación de un péptido está definida por tres ángulos diedros (también conocidos como ángulos de torsión) de-

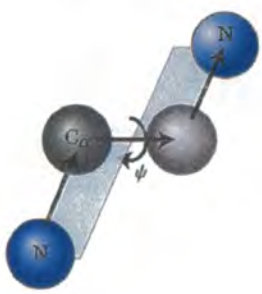


El oxígeno carbonílico tiene carga parcial negativa y el nitrógeno amida carga parcial positiva, lo que da lugar a un pequeño dipolo eléctrico. Prácticamente todos los enlaces peptídicos de proteínas se encuentran en configuración trans, aunque hay excepciones como la representada en la Figura 4-7b.

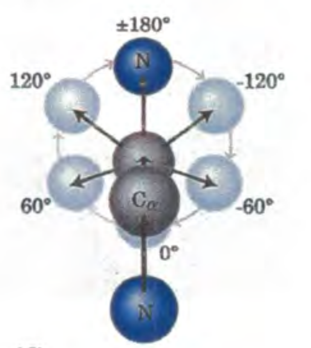
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 4–2 El grupo peptídico plano. (a) Cada enlace peptídico tiene carácter parcial de doble enlace debido a la resonancia, y no puede girar. (b) Tres enlaces separan los carbonos α consecutivos en una cadena polipeptídica. Los enlaces N—C_α y C_α—C pueden rotar, según ángulos diedros que se denominan ϕ y ψ, respectivamente. El enlace peptídico C—N no puede rotar libremente. Otros enlaces sencillos de la cadena principal pueden tener también impedida la rotación, según el tamaño y carga de los grupos R. (c) Átomos y planos que describen ψ. (d) Por convención, se considera que los ángulos ϕ y ψ tienen un valor de 180° (o –180°) cuando el primer y cuarto átomos se encuentran lo más alejados posible y el péptido está completamente extendido. Si el observador mira en la dirección del enlace que rota (en cualquier dirección) los ángulos ϕ y ψ aumentan cuando el cuarto átomo gira en el sentido de las agujas del reloj con relación al primero. En las proteínas, algunas de las conformaciones aquí mostradas (como 0°) están prohibidas a causa de impedimentos estéricos entre átomos. De (b) a (d), las bolas que representan átomos son más pequeñas que el radio de van der Waals a esta escala.

nominados ϕ (fi), ψ (psi) y ω (omega), que describen la rotación alrededor de cada uno de los tres enlaces repetidos en la cadena principal. Un ángulo diedro es el ángulo formado por la intersección de dos planos. En el caso de los péptidos, los planos se definen por los vectores de enlace de la cadena principal. Dos vectores de enlace sucesivos describen un plano. Tres vectores de enlace sucesivos describen dos planos (el vector de enlace central es común a los dos; Fig. 4–2c), y el ángulo entre los dos planos es lo que medimos para describir la conformación de la proteína.

CONVENCION CLAVE: Los importantes ángulos diedros de un péptido se definen mediante tres vectores de enlace que conectan cuatro átomos consecutivos de la cadena principal (esqueleto polipeptídico) (Fig. 4–2c): ϕ incluye los enlaces C—N—C_α—C (la rotación tiene lugar alrededor del enlace N—C_α), mientras que ψ incluye los enlaces N—C_α—C—N. Tanto ϕ como ψ tienen, por convención, valores de ± 180° cuando el polipéptido se halla completamente extendido y todos los grupos peptídicos se encuentran en el mismo plano (Fig. 4–2d). Al mirar en la dirección del vector del enlace central (como se ve en la Fig. 4–2c para el caso de ψ), los ángulos diedros aumentan al rotar el átomo distal (el cuarto) en el sentido de las agujas del reloj (Fig. 4–2d). Desde la posición de ± 180°, el ángulo diedro aumenta desde –180° a 0°, en cuyo punto los átomos primero y cuarto se eclipsan. Continuando la rotación desde 0° a +180° (la misma posición que –180°) se llega a la misma estructura inicial. No se suele considerar el tercer ángulo diedro, ω. Éste incluye los enlaces C_α—C—N—C_α. En este caso el enlace central es el peptídico, cuya rotación está limitada. El enlace peptídico se encuentra normalmente (el 99,6% del tiempo) en la configuración trans, limitando el valor de ω a ± 180°. El valor de ω es de 0° para el caso poco frecuente de un enlace peptídico en cis. ■

En principio, ϕ y ψ pueden adoptar cualquier valor entre –180° y +180°, pero muchos de estos valores no son posibles a causa de las interferencias estéricas entre átomos del esqueleto polipéptídico y de las cadenas laterales de los aminoácidos. La conformación en la que ϕ y ψ valen 0 es una de las inaccesibles (Fig. 4–2d); este valor se usa meramente como punto de referencia para describir los ángulos diedros. Los valores permitidos para ϕ y ψ pueden visualizarse gráficamente representando ϕ frente a ψ, en lo que se denomina **representación**

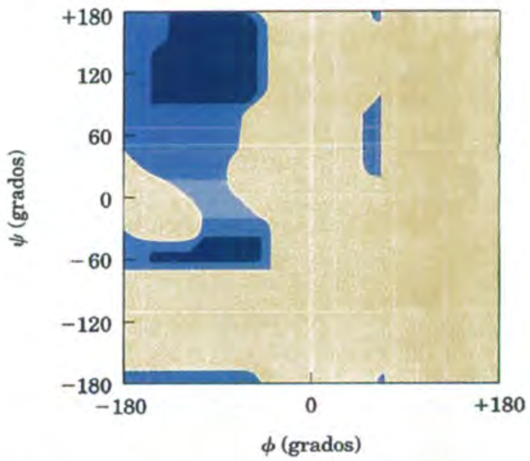


FIGURA 4–3 Representación de Ramachandran para los residuos de L–Ala. Las conformaciones de los péptidos se definen por los valores de ϕ y ψ. Basándose en cálculos en los que se utilizan radios de van der Waals y ángulos diedros, las conformaciones consideradas posibles son las que implican poca o ninguna interferencia estérica. Las áreas sombreadas de azul oscuro reflejan conformaciones sin solapamiento estérico y que, por tanto, están totalmente permitidas; el azul de intensidad media indica conformaciones permitidas en los límites extremos de contactos atómicos desfavorables; finalmente, el área azul claro indica conformaciones que están permitidas si se permite cierta flexibilidad de los ángulos diedros. Las regiones amarillas representan conformaciones no permitidas. La estereoquímica de los residuos L–aminoácidos origina la asimetría de la representación. Las representaciones para otros residuos aminoácidos no ramificados de la serie L son prácticamente idénticas. Los márgenes permitidos para los residuos aminoácidos ramificados tales como Val, Ile y Thr son algo más pequeños que para Ala. El residuo de Gly, el que tiene menos impedimentos estéricos, presenta un margen mucho más amplio de conformaciones permitidas. El margen para los residuos de Pro está muy restringido debido a que el valor de ϕ está limitado por su cadena lateral cíclica a un margen entre −35° a −85°.

de Ramachandran (Fig. 4–3), introducida por G.N. Ramachandran.

RESUMEN 4.1 Visión general sobre la estructura proteica

- Toda proteína posee un estructura tridimensional, que es un reflejo de su función.
- La estructura proteica está estabilizada por múltiples interacciones débiles. Las interacciones hidrofóbicas son las que más contribuyen en la estabilización de la forma globular de la mayoría de proteínas solubles; los enlaces de hidrógeno y las interacciones iónicas se encuentran optimizadas en las estructuras más termodinámicamente estables.
- La naturaleza de los enlaces covalentes en el esqueleto polipeptídico impone limitaciones en la estructura. El enlace peptídico tiene un carácter de doble enlace parcial que mantiene a los seis átomos del grupo peptídico en una configuración plana rígida. Los enlaces N—C_α y C_α— C pueden rotar y definen los ángulos diedros ϕ y ψ, respectivamente.

4.2 Estructura secundaria de las proteínas

El término **estructura secundaria** se refiere a cualquier segmento específico de una cadena polipeptídica y describe la distribución espacial local de los átomos de su cadena principal, sin tener en cuenta la conformación de sus cadenas laterales ni su relación con otros segmentos. Una estructura secundaria se considera *regular* cuando todos los ángulos diedros ϕ y ψ adoptan valores iguales, o casi iguales, en todo el segmento. Existe un número limitado de estructuras secundarias que son muy estables y que se encuentran ampliamente distribuidas en las proteínas. Las más destacables son la conformación en hélice α y la conformación β; otro tipo común recibe el nombre de giro β. Allí donde no se observa una estructura regular, la estructura secundaria se suele describir como indefinida o como ovillo estadístico. Sin embargo, esta última denominación no describe correctamente la estructura de estos segmentos. En la mayoría de proteínas el camino que sigue una cadena polipeptídica no es al azar, sino que es prácticamente constante y altamente específico para la estructura y función de cada proteína en particular. A continuación se describirán las estructuras regulares más frecuentes.

La hélice α es una estructura secundaria frecuente en las proteínas

Arquitectura de proteínas—Hélice α Pauling y Corey fueron conscientes de la importancia de los enlaces de hidrógeno en la orientación de los grupos químicos polares tales como el C=O y el N—H del enlace peptídico. Eran también conocedores de los resultados experimentales de William Astbury, quien en la década de 1930 había llevado a cabo un trabajo pionero sobre las proteínas con rayos X. Astbury demostró que la proteína que constituye las púas del puerco espín y el cabello (la proteína fibrosa α–queratina) posee una estructura regular que se repite cada 5,15 a 5,2 Å. (El angstrom, Å, nombre debido al físico Anders J. Ångström, es igual a 0,1 nm. Aunque no es una unidad del Sistema Internacional (SI), es utilizada universalmente por los biólogos estructurales para describir distancias atómicas: equivale aproximadamente a la longitud de un enlace C—H típico.) Con esta información y sus datos acerca del enlace peptídico, y con la ayuda de modelos moleculares precisos, Pauling y Corey se propusieron determinar cuáles eran las conformaciones más probables de las moléculas de proteína.

La disposición más sencilla que podría adoptar una cadena polipeptídica, teniendo en cuenta la rigidez de sus enlaces peptídicos (y también la libertad de rotación de los demás enlaces sencillos) es una estructura en hélice, a la que Pauling y Corey denominaron **hélice α (Fig. 4–4)**. En esta estructura el esqueleto polipeptídico se encuentra estrechamente enrollado alrededor de un eje imaginario dibujado longitudinalmente por el centro de la hélice, y los grupos R de los residuos aminoácidos sobresalen hacia fuera del esqueleto helicoidal. La unidad repetitiva es el giro de hélice que ocupa alrededor de 5,4 Å a lo largo del eje longitudinal, ligeramente superior a la periodicidad observada por Astbury en su análisis por rayos X de la queratina del cabello. Los residuos aminoácidos de una hélice α prototípica adoptan la conformación que corresponde a unos ángulos ϕ = −57° y ψ = −47°, y cada giro de la hélice incluye 3,6 residuos aminoácidos. Los segmentos α-helicoidales de las proteínas

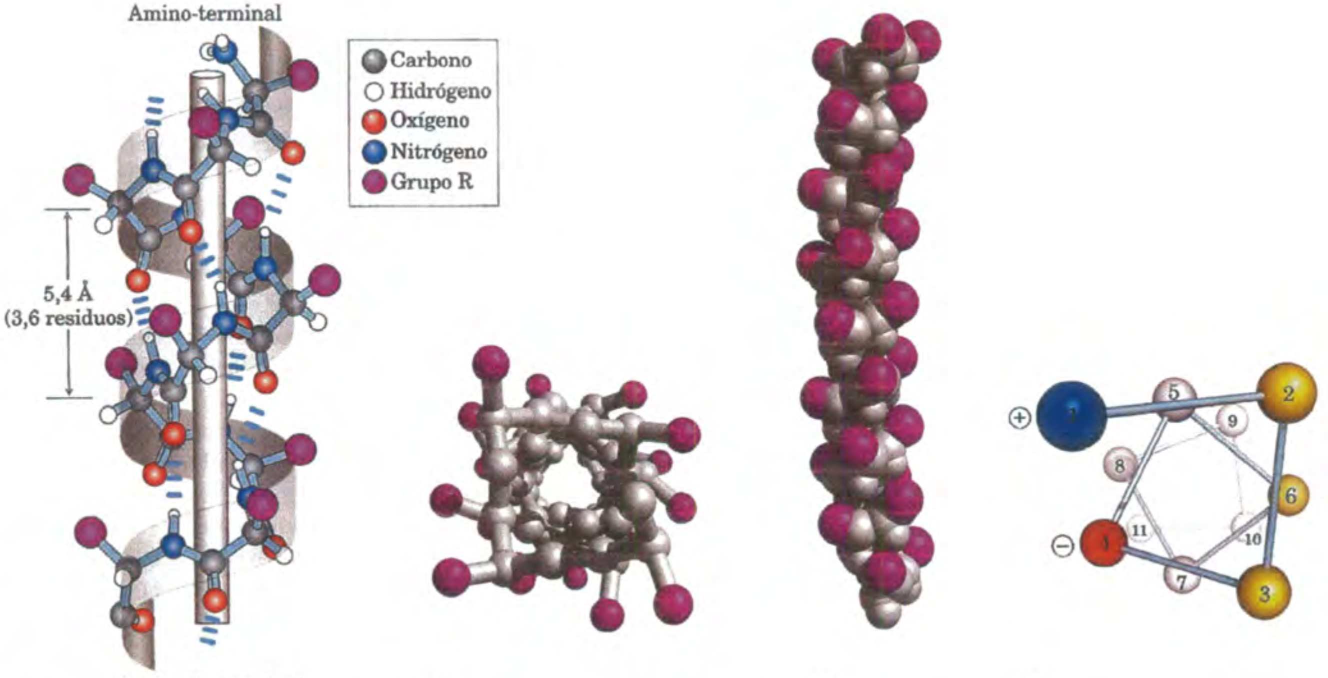


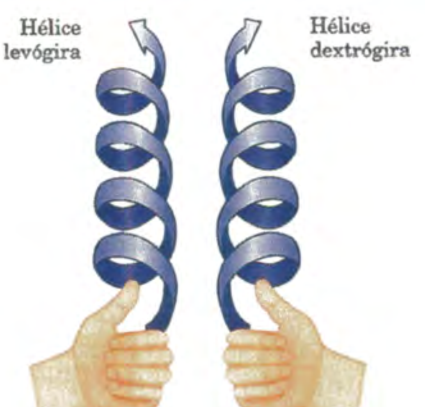
FIGURA 4–4 Modelos de hélice α en los que se muestran diferentes aspectos de su estructura. (a) Modelo de bolas y varillas en el que se muestran los enlaces de hidrógeno intracatenarios. La unidad repetitiva es una vuelta de hélice, de 3,6 residuos. (b) La hélice α vista desde un extremo en la dirección del eje longitudinal (obtenida a partir de PDB ID 4TNC). Obsérvense las posiciones de los grupos R, representados por esferas púrpura. Este modelo de bolas y varillas, que resalta la disposición helicoidal, da la falsa impresión de que la hélice está hueca porque las bolas no representan los radios de van der Waals de los átomos individuales. (c) Como muestra el modelo de esferas de van der Waals, los átomos en el centro de la hélice α están en contacto muy cercano. (d) Proyección de rueda helicoidal de una hélice α. En esta representación se utilizan colores para identificar superficies con propiedades particulares. Los residuos amarillos, por ejemplo, podrían ser hidrofóbicos y adecuarse a la posible interfase entre esta hélice y otra parte del mismo o de otro polipéptido. Los residuos rojo y azul ilustran el potencial de interacción entre cadenas laterales cargadas negativa y positivamente cuando están separadas por dos residuos de la hélice.

suelen desviarse ligeramente de estos valores para los ángulos diedros, que incluso varían ligeramente dentro de un mismo segmento contiguo, generando pequeñas curvaturas o dobleces en el eje de la hélice. El giro de la hélice α es dextrógiro en todas las proteínas (Recuadro 4–1). Se demostró que la estructura predominante en α-queratinas es la hélice α. De modo más general, en las proteínas globulares se observa que aproximadamente una cuarta parte de los residuos aminoácidos se encuentra formando hélices α, aunque la proporción exacta varía mucho de una proteína a otra.

¿Cuál es la razón de que se forme la hélice α con más facilidad que otras conformaciones posibles? La respuesta es, en parte, que la hélice α hace un uso óptimo de los puentes de hidrógeno internos. La estructura se encuentra estabilizada por un enlace de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno unido al átomo de nitrógeno electronegativo de un enlace peptídico y el

RECUADRO 4–1 MÉTODOS Cómo distinguir dextrógiro de levógiro

Existe un método sencillo para determinar el sentido de giro, dextrógiro o levógiro, de una estructura helicoidal. Cierre los puños dejando el pulgar estirado y dirigido hacia arriba. Observando su mano derecha, imagine una hélice que se prolonga en la dirección indicada por el pulgar y con su espiral girando en el sentido en que se pliegan los otros cuatro dedos (el de las agujas del reloj). La hélice resultante es dextrógira. La repetición del proceso con la mano izquierda proporcionará la imagen de la hélice levógira, que gira en dirección en el sentido contrario al de las agujas del reloj si la hélice se prolonga en la dirección del pulgar.



átomo de oxígeno carbonílico electronegativo del cuarto aminoácido que se encuentra del lado amino-terminal con respecto al mismo (Fig. 4–4a). Cada uno de los enlaces peptídicos de la hélice α (excepto los que están próximos a cada extremo de la hélice) participa en esta trama de enlaces de hidrógeno. Cada vuelta sucesiva de la hélice α se mantiene unida a las vueltas adyacentes mediante tres o cuatro enlaces de hidrógeno que proporcionan a la estructura global una estabilidad considerable.

Experimentos posteriores con modelos moleculares han demostrado que una hélice α se puede formar en polipéptidos tanto con L- como con D-aminoácidos. Sin embargo, todos los residuos deben pertenecer a la misma serie de estereoisómeros; un D-aminoácido rompería una estructura regular constituida por L-aminoácidos y viceversa. En principio, los L-aminoácidos naturales pueden formar hélices α dextrógiras o levógiras, pero las hélices α levógiras largas son teóricamente menos estables y no se han observado en proteínas.

EJEMPLO PRÁCTICO 4–1 Estructura secundaria y dimensiones de una proteína

¿Cuál es la longitud de un polipéptido con 80 residuos aminoácidos en una hélice α única y continua?

Solución: Una hélice α ideal tiene 3,6 residuos por vuelta con un desplazamiento a lo largo del eje helicoidal de 5,4 Å. Así pues, el desplazamiento a lo largo del eje por cada residuo aminoácido es de 1,5 Å. Podemos deducir que la longitud del polipépido es, por tanto, 80 residuos × 1,5 Å/residuo = 120 Å.

La secuencia de aminoácidos afecta a la estabilidad de la hélice α

No todos los polipéptidos pueden formar una hélice α estable. Cada residuo aminoácido de un polipéptido tiene una tendencia intrínseca a formar hélice α (Tabla 4–1), lo que refleja las propiedades del grupo R y el modo en que éstas afectan la capacidad de los átomos de cadena principal colindantes para adaptarse a los valores característicos de los ángulos ϕ y ψ. La alanina es la que muestra la mayor tendencia a formar hélices α en la mayoría de modelos experimentales.

La posición de un residuo aminoácido con respecto a sus vecinos es también importante. Las interacciones entre cadenas laterales de aminoácidos pueden estabilizar o desestabilizar la estructura α helicoidal. Por ejemplo, si una cadena polipeptídica posee muchos residuos Glu consecutivos, este segmento de la cadena no podrá formar una hélice a pH 7,0. Los grupos carboxílicos cargados negativamente de los residuos Glu adyacentes se repelen con una intensidad que impiden la formación de la hélice α. Por la misma razón, si muchos residuos Lys y/o Arg, con grupos polares cargados positivamente a pH 7,0 están situados consecutivamente, se repelerán e impedirán la formación de la hélice α. El tamaño y la forma de los residuos Asn, Ser, Thr y Cys pueden desestabilizar la hélice α si se hallan muy cercanos en la cadena.

El giro de la hélice α implica la existencia de interacciones críticas entre la cadena lateral de un aminoácido y la cadena

TABLA 4–1 Tendencia de los aminoácidos a adoptar la conformación en hélice α

Aminoácido	$\Delta\Delta G°$ (kJ/mol)*	Aminoácido	$\Delta\Delta G°$ (kJ/mol)*
Ala	0	Leu	0,79
Arg	0,3	Lys	0,63
Asn	3	Met	0,88
Asp	2,5	Phe	2,0
Cys	3	Pro	>4
Gln	1,3	Ser	2,2
Glu	1,4	Thr	2,4
Gly	4,6	Tyr	2,0
His	2,6	Trp	2,0
Ile	1,4	Val	2,1

Fuentes: Los datos (excepto Pro) están extraídos de Bryson, J.W., Betz, S.F., Lu, H.S., Suich, D.J., Zhou, H.X., O'Neil, K.T. & DeGrado, W.F. (1995) Protein design: a hierarchic approach. *Science* **270**, 935. Los datos de prolina de Myers, J.K., Pace, C.N. & Scholtz, J.M. (1997) Helix propensities are identical in proteins and peptides. *Biochemistry* **36**, 10,926.

*$\Delta\Delta G°$ es la diferencia en la variación de energía libre, relativa al valor de la alanina, necesaria para que el residuo aminoácido adquiera la conformación en hélice α. Los valores más altos reflejan una mayor dificultad para adoptar esta estructura. Los datos son el resumen de múltiples experimentos en múltiples sistemas.

lateral que se encuentra tres (o a veces cuatro) aminoácidos separada de ella en cualquiera de las dos direcciones. Esto es evidente observando la hélice α como una rueda helicoidal (Fig. 4–4d). Los aminoácidos cargados positivamente se encuentran a menudo a tres residuos de distancia de aminoácidos cargados negativamente, lo que permite la formación de pares iónicos. A menudo se observa también un espaciamiento similar en el caso de dos aminoácidos aromáticos, lo que da lugar a una interacción hidrofóbica.

Una de las restricciones a la formación de la hélice α es la presencia de residuos de Pro o Gly, que son los menos proclives a formarla. En la prolina, el átomo de nitrógeno forma parte de un anillo rígido (Fig. 4–7b), por lo que la rotación alrededor del enlace N—C_α no es posible. Así, un residuo Pro introduce una curvatura desestabilizante en la hélice α. Además, el átomo de nitrógeno de un residuo de Pro en un enlace peptídico no contiene ningún átomo de hidrógeno que pueda formar enlaces de hidrógeno con otros residuos. Por estas razones es rara la presencia de prolina en las hélices α. La razón de que raramente se encuentre glicina en las hélices α es diferente: tiene más flexibilidad conformacional que los otros residuos aminoácidos. Los polímeros de glicina tienden a formar estructuras arrolladas totalmente diferentes de las hélices α.

Finalmente, otro factor que afecta a la estabilidad de una hélice α es la identidad de los residuos aminoácidos localizados cerca de los extremos del fragmento α-helicoidal del polipéptido. En cada enlace peptídico existe un pequeño dipolo eléctrico (Fig 4–2a). Estos dipolos están alineados a través de los enlaces de hidrógeno de la hélice, que resulta en un dipolo neto a lo largo del eje y que aumenta con la longitud de la hélice **(Fig. 4–5)**. Los cuatro residuos aminoácidos de cada extremo de la hélice no participan plenamente en la formación de enlaces de hidró-

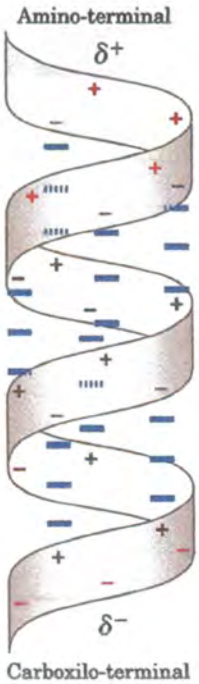


FIGURA 4–5 Dipolo de la hélice. El dipolo eléctrico de un enlace peptídico (véase la Fig. 4–2a) se transmite a lo largo de un segmento en hélice α a través de enlaces de hidrógeno intracatenarios, dando como resultado un dipolo global en la hélice. En esta ilustración los constituyentes amino y carbonilo de cada enlace peptídico se indican por símbolos + y −, respectivamente. Los grupos amino y carbonilo no enlazados por enlace de hidrógeno y situados cerca de los extremos de la región en hélice α se muestran en rojo.

geno. Las cargas parciales positivas y negativas del dipolo de la hélice residen en los grupos amino y carbonilo peptídicos situados respectivamente cerca de los extremos amino-terminal y carboxilo-terminal de la hélice. Por esta razón a menudo se encuentran aminoácidos cargados negativamente cerca del extremo amino-terminal del segmento helicoidal, donde ejercen una interacción estabilizadora con la carga positiva del dipolo de la hélice; un aminoácido cargado positivamente situado en el extremo amino-terminal es desestabilizante. Lo contrario es también cierto para el extremo carboxilo-terminal del segmento helicoidal.

En resumen, existen cinco tipos de restricciones diferentes que afectan a la estabilidad de una hélice α: (1) la tendencia intrínseca de cada residuo aminoácido a formar una hélice α; (2) las interacciones entre grupos R, en particular los que se encuentran a tres (o cuatro) residuos de distancia; (3) el volumen de los grupos R adyacentes; (4) la presencia de residuos de Pro y Gly, y (5) las interacciones entre residuos aminoácidos en los extremos del segmento hélicoidal y el dipolo eléctrico inherente a la hélice α. Por consiguiente, la tendencia de un segmento determinado de una cadena polipeptídica a plegarse en hélice α depende de la identidad y de la secuencia de residuos aminoácidos en el segmento.

La conformación β organiza las cadenas polipeptídicas en forma de hoja

Arquitectura de proteínas—Hoja β En 1951, Pauling y Corey predijeron un segundo tipo de estructura repetitiva, la **conformación β**. Ésta es una conformación más extendida de las cadenas polipeptídicas y su estructura se ha confirmado mediante análisis de rayos X. En la conformación β el esqueleto de la cadena polipeptídica se encuentra extendido en zig-zag en lugar de plegarse como una hélice (**Fig. 4–6**). Las cadenas polipeptídicas en zig-zag pueden disponerse de manera adyacente formando una estructura que semeja una serie de pliegues. En esta disposición, denominada **hoja β**, se forman enlaces de hidrógeno entre segmentos adyacentes de cadena polipeptídica. Los segmentos individuales que forman una hoja β son normalmente cercanos dentro de la cadena polipeptídica, pero también pueden estar muy β distantes uno de otro en la secuencia lineal del polipéptido; incluso pueden estar en cadenas

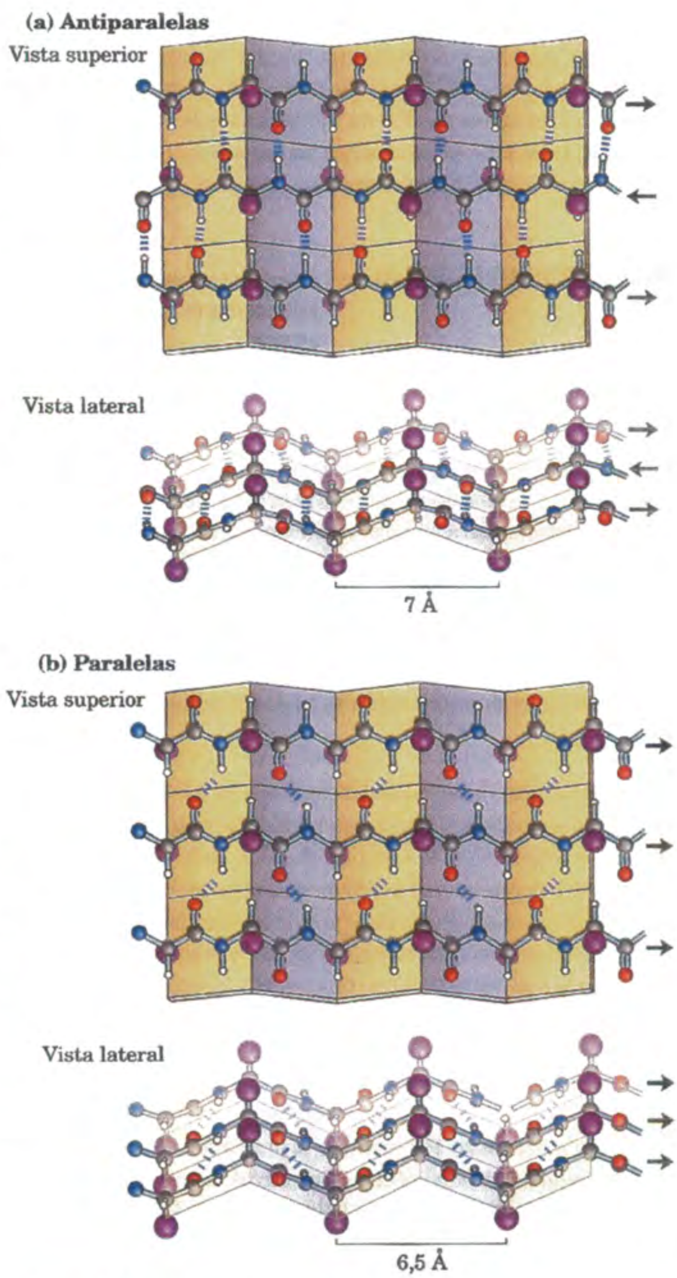


FIGURA 4–6 La conformación β en cadenas polipeptídicas. En estas vistas superior y lateral pueden verse los grupós R dirigidos hacia el exterior de la hoja β y se enfatiza el plegamiento de la hoja descrito por los planos de los enlaces peptídicos. (Un nombre alternativo para esta estructura es hoja β plegada.) También se muestran los enlaces por puente de hidrógeno entre cadenas adyacentes. La orientación amino-terminal a carboxilo-terminal de las cadenas adyacentes (flechas) puede ser la misma o la opuesta, formando **(a)** una hoja β antiparalela o **(b)** una hoja β paralela.

polipeptídicas diferentes. Los grupos R de aminoácidos adyacentes sobresalen de la estructura en zig-zag en direcciones opuestas, dando lugar a un patrón alternante tal como se observa en las vistas laterales de la Fig. 4–6.

Las cadenas polipeptídicas adyacentes de una hoja β pueden ser paralelas o antiparalelas (con la misma orientación amino-carboxilo o la opuesta, respectivamente). Las estructuras tienen cierta similitud, aunque el período de repetición es más corto en la conformación paralela (6,5 Å, en comparación con los 7 Å de la antiparalela) y los patrones de formación de puentes de hidrógeno son diferentes. Las estructuras ideales corresponden a $\phi = -119°$, $\psi = +113°$ (paralela) y $\phi = -139°$, $\psi = +135°$ (antiparalela); estos valores varían ligeramente en proteínas reales, generando cierta variabilidad estructural, como ya se ha visto para las hélices α.

Algunas estructuras proteicas limitan los tipos de aminoácidos que pueden encontrarse en las estructuras β. Cuando dos o más hojas β se encuentran densamente empaquetadas en una proteína, los grupos R de los residuos aminoácidos de las superficies de contacto deben ser relativamente pequeños. Las β-queratinas tales como la fibroína de la seda y la fibroína de las telas de araña tienen un contenido muy elevado de residuos Gly y Ala, los dos aminoácidos que poseen los grupos R más pequeños. De hecho, en la fibroína de la seda, Gly y Ala se alternan a lo largo de grandes porciones de la secuencia.

Los giros β son frecuentes en las proteínas

Arquitectura de proteínas—Giros β En las proteínas globulares, con una estructura de plegamiento compacta, aproximadamente un tercio de los residuos de aminoácidos están en giros o bucles donde la cadena polipeptídica cambia de dirección **(Fig. 4–7)**. Éstos son elementos de conexión que unen tramos sucesivos de hélices α o conformaciones β. Los **giros β** que conectan los extremos adyacentes de dos segmentos de hojas β antiparalelas son especialmente frecuentes. Esta estructura forma un giro cerrado de 180° en el que están involucrados cuatro residuos aminoácidos, con el oxígeno del carbonilo del primer residuo aminoacídico formando un enlace de hidrógeno con el hidrógeno del grupo amino del cuarto. Los grupos peptídicos de los dos residuos centrales no participan en ningún enlace de hidrógeno interresidual. A menudo se encuentran residuos de Gly y Pro en los giros β. En el caso de la glicina ello es debido a que es un residuo pequeño y flexible, mientras que para Pro es la facilidad con que los enlaces peptídicos en los que participa el nitrógeno imino de la prolina adoptan la configuración cis (Fig. 4–7b), particularmente adecuada para la formación de un giro cerrado. De entre los diversos tipos de giro β, los dos que se muestran en la Figura 4–7a son los más comunes. Los giros β se encuentran a menudo cerca de la superficie de las proteínas, donde los grupos peptídicos de los dos residuos aminoácidos centrales en el giro pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua. Con menos frecuencia se encuentran los giros γ, que constan de tres residuos con un enlace de hidrógeno entre el primero y el tercero.

Las estructuras secundarias comunes tienen ángulos diedros característicos

La hélice α y la conformación β son las estructuras secundarias repetitivas más importantes en gran número de proteínas, aunque existen otras estructuras repetitivas en algunas proteínas especializadas (un ejemplo es el colágeno, véase la Fig. 4–12). Todas las estructuras secundarias pueden describirse por completo mediante los ángulos diedros ϕ y ψ asociados con cada residuo. Como puede observarse en la representación de Ramachandran, la hélice α y la conformación β se encuentran dentro de la gama, relativamente restringida, de

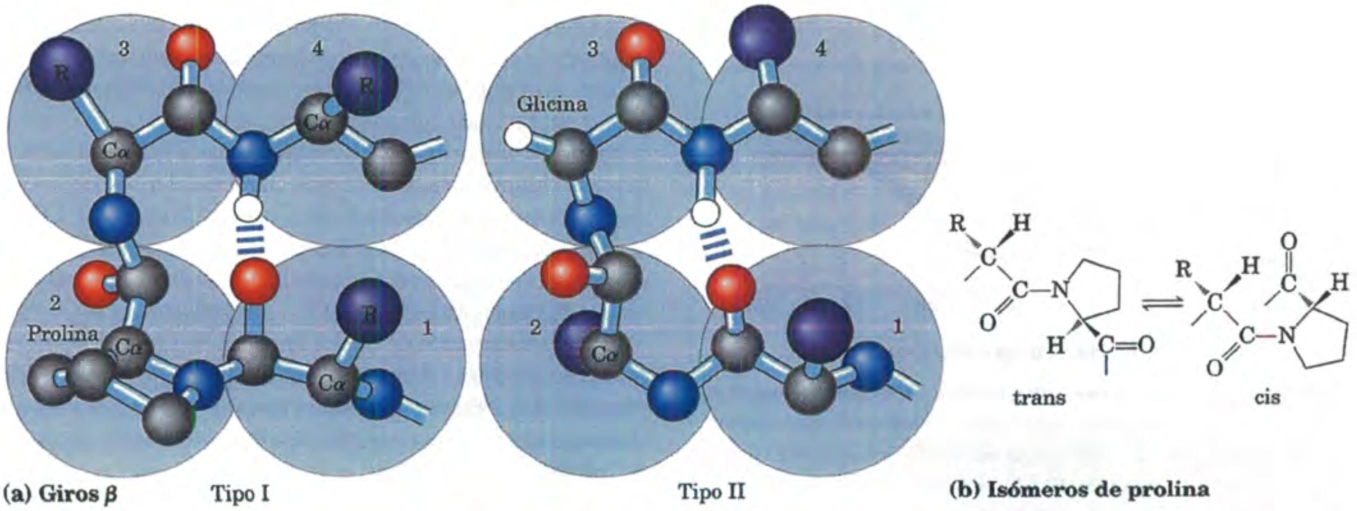


FIGURA 4–7 Estructura de los giros β. **(a)** Los giros β del tipo I y tipo II son los más comunes; el giro de tipo I aparece con una frecuencia superior al doble que el de tipo II. El tercer residuo que aparece en el giro β tipo II es habitualmente una Gly. Obsérvese el enlace de hidrógeno entre los grupos peptídicos de los residuos primero y cuarto del giro. (Los residuos de aminoácidos individuales aparecen enmarcados por grandes círculos azules.) **(b)** Los isómeros trans y cis de un enlace peptídico con el nitrógeno imino de una prolina. Más del 99,95% de los enlaces peptídicos entre aminoácidos que no sean la prolina se encuentran en la configuración trans. Sin embargo, aproximadamente un 6% de los enlaces peptídicos en los que interviene el nitrógeno imino de la prolina se encuentran en la configuración cis, y muchos de éstos se dan en los giros β.

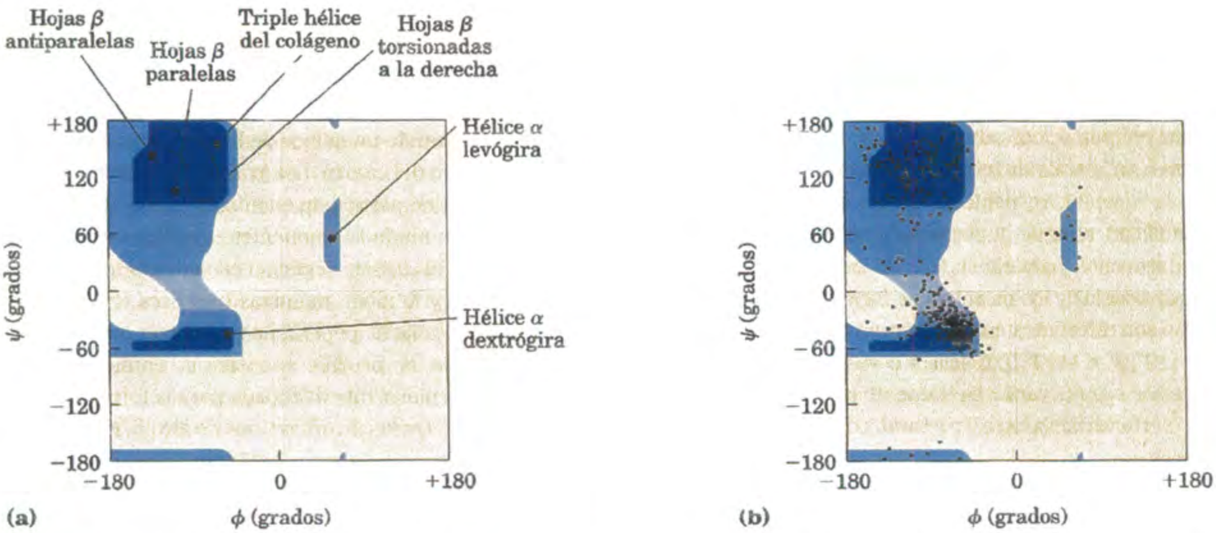


FIGURA 4–8 Representaciones de Ramachandran de diferentes estructuras. (a) Superposición de los valores de ϕ y ψ de diversas estructuras secundarias permitidas sobre la gráfica de la Figura 4–3. Aunque teóricamente las hélices α levógiras de varios residuos aminoácidos son posibles, no se han observado todavía en proteínas. (b) Los valores de ϕ y ψ de todos los residuos aminoácidos con excepción de la glicina del enzima piruvato quinasa (que se ha aislado del conejo) se superponen en la representación teórica de las conformaciones permitidas (véase la Figura 4–3). Se excluyeron los residuos de glicina pequeños y flexibles, puesto que frecuentemente caen fuera de los intervalos esperados (zonas azules).

estructuras permitidas estéricamente **(Fig. 4–8a)**. La mayor parte de los valores de ϕ y ψ obtenidos de estructuras proteicas conocidas se encuentran dentro de las regiones esperadas, observándose altas concentraciones cerca de los valores correspondientes a la hélice α y la conformación β, tal como era de esperar (Fig. 4–8b). El único aminoácido que se encuentra a menudo en una conformación que se halla fuera de las regiones mencionadas es la glicina. Gracias al pequeño tamaño de su cadena lateral, un residuo de glicina puede adoptar muchas conformaciones que están estéricamente prohibidas para otros aminoácidos.

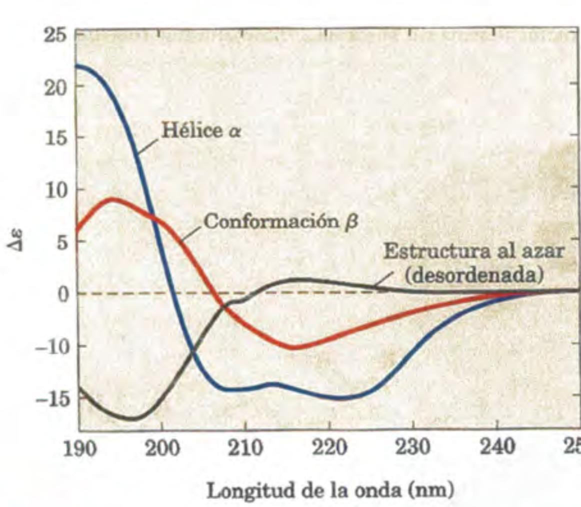


FIGURA 4–9 Espectroscopia de dicroísmo circular. Estos espectros muestran a la polilisina completamente en forma de hélice α, conformación β o como estructura desnaturalizada al azar. El eje *y* es una versión simplificada de las unidades utilizadas más frecuentemente en los experimentos de CD. Puesto que la curvas son diferentes para hélice α, conformación β y estructura al azar, el espectro de CD de una proteína determinada proporciona una estimación de la fracción de la proteína que se encuentra en cada una de las dos estructuras secundarias más comunes. El espectro de CD de la proteína nativa puede servir como referencia del estado plegado, lo que resulta útil en el seguimiento de la desnaturalización o de los cambios conformacionales inducidos por las condiciones de la disolución.

Las estructuras secundarias comunes pueden evaluarse mediante dicroísmo circular

La asimetría estructural de las moléculas da lugar a diferencias en la absorción de la luz polarizada en el plano a la derecha y la luz polarizada en el plano a la izquierda. La técnica que mide esta diferencia se denomina **espectroscopia de dicroísmo circular (CD).** Una estructura ordenada, por ejemplo una proteína plegada, da lugar a un espectro de absorción que puede tener picos o regiones con valores positivos o negativos. Los espectros de proteínas se obtienen en la región del UV lejano (190 a 250 nm). En esta región, la entidad que absorbe la luz, el cromóforo, es el enlace peptídico; cuando el enlace peptídico se halla en un entorno plegado se obtiene una señal. La diferencia de los coeficientes de extinción molar (véase el Recuadro 3–1) de la luz polarizada en el plano a la derecha y a la izquierda ($\Delta\varepsilon$) se representa en función de la longitud de onda. Las conformaciones α y β tienen espectros de CD característicos **(Fig. 4–9)**. Mediante los espectros de CD, los bioquímicos pueden determinar si las proteínas están correctamente plegadas, calcular qué fracción de proteína se encuentra plegada en una u otra estructura secundaria común y seguir las transiciones entre los estados plegado y desplegado.

RESUMEN 4.2 Estructura secundaria de las proteínas

- La estructura secundaria es la disposición espacial local de los átomos de la cadena principal en un determinado segmento de la cadena polipeptídica.

- Las estructuras secundarias regulares más comunes son la hélice α, la conformación β y los giros β.
- La estructura secundaria de un segmento polipeptídico puede definirse completamente si se conocen los valores de los ángulos ϕ y ψ de todos los aminoácidos del segmento.
- La espectroscopia de dicroísmo circular es un método útil para conocer la estructura secundaria y para seguir el plegamiento de proteínas.

4.3 Estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas

Arquitectura de proteínas—Introducción a la estructura terciaria La disposición tridimensional global de todos los átomos de una proteína se conoce como **estructura terciaria.** Mientras que el término "estructura secundaria" se refiere al ordenamiento espacial de residuos aminoácidos adyacentes en la estructura primaria de un polipéptido, la estructura terciaria incluye aspectos de *largo alcance* en la secuencia de aminoácidos. Aminoácidos que están alejados en la secuencia polipeptídica y que se encuentran en tipos de estructura secundaria diferentes pueden interaccionar dentro de la estructura totalmente plegada de la proteína. La localización de giros (incluidos los giros β) en la cadena polipeptídica y la dirección y el ángulo de estos giros están determinados por el número y la localización de aminoácidos específicos promotores de su formación, tales como Pro, Thr, Ser y Gly. Los segmentos que interaccionan dentro de la cadena polipeptídica se mantienen en su posición terciaria característica gracias a diferentes tipos de interacciones enlazantes débiles (y a veces mediante enlaces covalentes tales como puentes disulfuro) entre los segmentos.

Algunas proteínas están constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas o subunidades, que pueden ser idénticas o diferentes. La disposición de estas subunidades proteicas en complejos tridimensionales es la **estructura cuaternaria.**

Al considerar estos niveles superiores de estructura, es de utilidad clasificar las proteínas en dos grupos principales: **proteínas fibrosas,** que presentan cadenas polipeptídicas dispuestas en largas hebras u hojas, y **proteínas globulares** con las cadenas polipeptídicas plegadas en formas globulares o esféricas. Los dos grupos son estructuralmente diferentes: las proteínas fibrosas constan mayoritariamente de un único tipo de estructura secundaria y su estructura terciaria es relativamente simple. Las proteínas globulares contienen a menudo varios tipos de estructura secundaria. Estos dos grupos también difieren en su función: las estructuras que dan soporte, forma y protección externa a los vertebrados están formadas por proteínas fibrosas mientras que la mayoría de enzimas y proteínas reguladoras son globulares.

Las proteínas fibrosas están adaptadas a una función estructural

Arquitectura de proteínas—Estructura terciaria de las proteínas fibrosas La α-queratina, el colágeno y la fibroína de la seda son ejemplos claros de la relación entre estructura proteica y función biológica (Tabla 4–2). Estas proteínas comparten propiedades que confieren fuerza, flexibilidad, o las dos cosas, a las estructuras en las que se encuentran. En cada caso, la unidad estructural fundamental es la repetición de un elemento simple de estructura secundaria. Todas las proteínas fibrosas son insolubles en agua, una propiedad debida a la elevada concentración de residuos aminoácidos hidrofóbicos presentes tanto en el interior de estas proteínas como en su superficie. Estas superficies hidrofóbicas se encuentran sepultadas en gran parte en el interior debido al empaquetamiento de muchas cadenas polipeptídicas similares para formar elaborados complejos supramoleculares. La simplicidad estructural subyacente en las proteínas fibrosas las hace especialmente útiles para ilustrar algunos de los principios fundamentales de la estructura de proteínas discutidos anteriormente.

α-Queratina Las α-queratinas son proteínas que han evolucionado para poder soportar esfuerzos mecánicos. Presentes sólo en los vertebrados, estas proteínas constituyen la práctica totalidad del peso seco de cabellos, lana, uñas, garras, cañones de las plumas, cuernos, pezuñas y gran parte de la capa externa de la piel. Las α-queratinas pertenecen a una familia más amplia de proteínas denominadas proteínas de los filamentos intermedios (IF). Otras proteínas de esta familia están localizadas en el citoesqueleto de las células animales. Todas las proteínas IF tienen una función estructural y comparten las características estructurales ejemplificadas por las α-queratinas.

La hélice de la α-queratina es la misma hélice α dextrógira que se observa también en muchas otras proteínas. A principios de la década de 1950 Francis Crick y Linus Pauling sugirieron independientemente que las hélices α de la queratina estaban dispuestas formando una superhélice (coiled coil). Dos hebras de α-queratina orientadas en paralelo (con los extremos amino en el mismo lado) se enrollan una sobre otra formando un enrollamiento superhelicoidal. La resistencia de la estructura está amplificada por el enrollamiento en superhélice, de modo muy similar a como las cuerdas se enrollan para formar una soga más resistente **(Fig. 4–10)**. La torsión del eje de una

TABLA 4–2 Estructuras secundarias y propiedades de las proteínas fibrosas

Estructura	Características	Ejemplos
Hélice α, entrecruzada mediante enlaces disulfuro	Estructuras protectoras insolubles y resistentes, de dureza y flexibilidad variables	α-Queratina de cabello, plumas y uñas
Conformación β	Filamentos suaves y flexibles	Fibroína de la seda
Triple hélice del colágeno	Gran fuerza tensil, sin capacidad de estiramiento	Colágeno de los tendones, matriz ósea

hélice α al formar la estructura superenrollada explica la discrepancia entre los 5,4 Å entre vueltas predicha para una hélice α por Pauling y Corey y los 5,15 a 5,2 Å observados mediante difracción de rayos X en la estructura repetitiva del cabello (p. 117). El enrollamiento superhelicoidal es levógiro, en sentido opuesto al de la hélice α. La superficie donde las dos hélices α entran en contacto está formada por residuos de aminoácidos hidrofóbicos, y sus grupos R se engarzan entre ellos formando un patrón de entrecruzamiento regular. Esto permite un empaquetamiento compacto de las cadenas polipeptídicas en la superhélice levógira. No es sorprendente que la α-queratina sea rica en los residuos hidrofóbicos Ala, Val, Leu, Ile, Met y Phe.

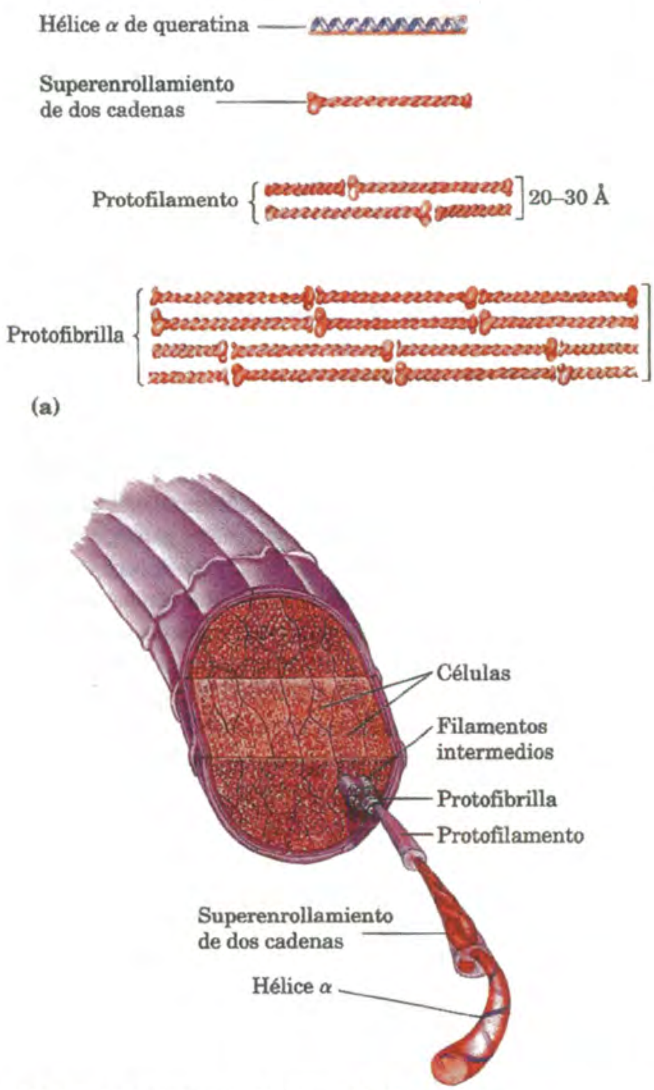


FIGURA 4–10 Estructura del cabello. **(a)** la α-queratina del cabello es una hélice α alargada que presenta elementos algo más gruesos cerca de los extremos amino y carboxilo. Las hélices se enrollan entre ellas por parejas en sentido levógiro, formando superenrollamientos de dos cadenas. Éstas forman a su vez unas estructuras de orden superior: los protofilamentos y las protofibrillas. Cerca de cuatro protofibrillas, 32 hebras de α-queratina en total, se combinan para formar un filamento intermedio. Las hélices superenrolladas de dos en dos cadenas presentes en las diversas estructuras parecen estar también entrelazadas, pero se desconoce el sentido de este enrollamiento superior así como otros detalles estructurales. **(b)** Un cabello es una disposición de muchos filamentos de α-queratina, formados por subestructuras como las que se muestran en **(a)**.

Un polipéptido individual de α-queratina superenrollada presenta una estructura terciaria relativamente simple, dominada por la estructura secundaria de la hélice α con su eje helicoidal adaptado a una superhélice levógira. El enrollamiento de los dos polipéptidos en hélice α es un ejemplo de estructura cuaternaria. Los superenrrollamientos de este tipo se presentan con frecuencia en los elementos estructurales de las proteínas filamentosas y en la proteína muscular miosina (véase la Fig. 5–27). La estructura cuaternaria de la α-queratina puede ser muy compleja. Muchas estructuras superenrolladas pueden ensamblarse en grandes complejos supramoleculares del mismo modo en que la α-queratina forma los filamentos intermedios del pelo (Fig. 4–10b).

La resistencia de las proteínas fibrosas se refuerza también gracias a entrecruzamientos covalentes entre las cadenas polipeptídicas que forman las "cuerdas" de hélices múltiples y entre cadenas adyacentes de una superestructura molecular. En las α-queratinas los entrecruzamientos que estabilizan la estructura cuaternaria son enlaces disulfuro (Recuadro 4–2). En las α-queratinas más duras y resistentes, tales como las de los cuernos de rinoceronte, se observa que hasta un 18% de los residuos son cisteínas que forman puentes disulfuro.

Colágeno Al igual que las α-queratinas el colágeno ha evolucionado para proporcionar fuerza. Se encuentra en el tejido conjuntivo de, por ejemplo, tendones, cartílagos, matriz orgánica de los huesos y córnea del ojo. La hélice del colágeno es una estructura secundaria única ($\phi = -51°$, $\psi = +153°$), bastante dis-

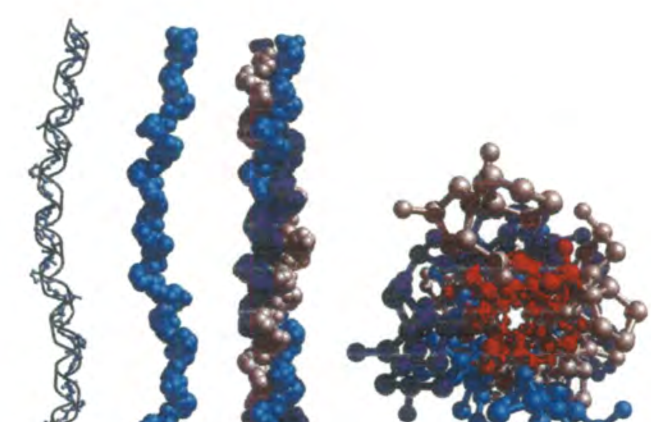
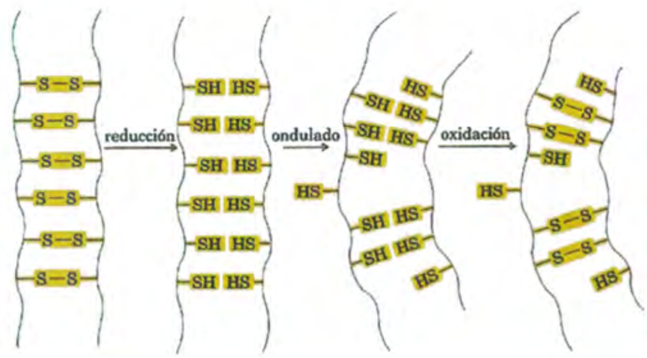


FIGURA 4–11 Estructura del colágeno. (De PDB ID 1CGD.) **(a)** La cadena α del colágeno tiene una estructura secundaria repetitiva que sólo se encuentra en esta proteína. La secuencia repetitiva tripeptídica Gly–X–Pro o Gly–X–4-Hyp adopta una estructura helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. La secuencia repetitiva empleada para generar este modelo es Gly–Pro–4-Hyp. **(b)** Modelo de esferas de la misma cadena α. **(c)** Tres de estas hélices (mostradas aquí en gris, azul y violeta) se enrollan entre sí de forma dextrógira. **(d)** La superhélice de tres cadenas del colágeno vista desde un extremo, en una representación de bolas y varillas. Los residuos de glicina se representan en rojo. La glicina es necesaria en el lugar en que las tres cadenas entran en contacto a causa de su pequeño tamaño. En esta ilustración las bolas no representan el radio de van der Waals de los átomos individuales. El centro de la superhélice de tres cadenas no está hueco como aquí aparece, sino que está firmemente empaquetado.

RECUADRO 4–2 La ondulación permanente es un ejemplo de ingeniería bioquímica

Cuando se expone el cabello al calor húmedo, se puede estirar. A nivel molecular, las hélices α de la α-queratina del cabello se estiran hasta que llegan a adoptar una conformación β totalmente extendida. Al enfriarse revierten espontáneamente a la conformación de hélice α. Esta característica "estirabilidad" de las α-queratinas y su elevado contenido en enlaces disulfuro constituyen la base de la ondulación permanente. El cabello a ondular se arrolla primero de la manera deseada. A continuación se aplica en caliente una disolución de agente reductor, por lo general un compuesto que contiene un grupo tiol o sulfhidrilo (–SH). El agente reductor rompe los entrecruzamientos mediante la reducción de cada enlace disulfuro a dos residuos Cys. El calor húmedo rompe los enlaces de hidrógeno y hace que la estructura α-helicoidal de las cadenas polipeptídicas se desenrolle. Transcurrido un cierto tiempo, se elimina la disolución de agente reductor y se añade un agente oxidante que estabiliza los enlaces disulfuro *nuevos* formados entre parejas de Cys de cadenas polipeptídicas adyacentes, y que no se corresponden ya con las anteriormente presentes. Al lavar y enfriar el cabello, la cadena polipeptídica revierte a su conformación en hélice α. Así el cabello queda ondulado del modo deseado, puesto que los nuevos enlaces disulfuro formados ejercerán algún tipo de torsión y giro sobre los haces de hélices α de las fibras del cabello. Puede aplicarse el mismo proceso para estirar un cabello naturalmente ondulado. La ondulación permanente (o su estiramiento) no es de hecho permanente ya que el cabello crece; en el cabello nuevo que reemplaza al antiguo, la α-queratina presenta el patrón natural de enlaces disulfuro.



tinta de la hélice α. Es levógira y tiene tres residuos aminoácidos por vuelta **(Fig. 4–11)**. El colágeno también es una estructura superenrollada, pero con estructuras terciaria y cuaternaria específicas: tres cadenas polipeptídicas separadas, denominadas cadenas α (no deben confundirse con hélices α), están superenrolladas una alrededor de la otra (Fig. 4–11c). En el colágeno el enrollamiento superhelicoidal es dextrógiro, en sentido opuesto a la hélice levógira de las cadenas α.

Existen muchos tipos de colágeno en vertebrados. Normalmente contienen aproximadamente un 35% de Gly, un 11% de Ala y un 21% de Pro y de 4-Hyp (4-hidroxiprolina, un aminoácido no estándar; véase la Fig. 3–8a). El producto alimenticio gelatina deriva del colágeno; a pesar de que su naturaleza es proteica, tiene poco valor alimenticio porque el colágeno carece de cantidades significativas de muchos aminoácidos esenciales en la dieta humana. El contenido de aminoácidos no habituales en el colágeno está relacionado con restricciones estructurales características de la hélice del colágeno. La secuencia de aminoácidos del colágeno corresponde generalmente a la repetición de un tripéptido del tipo Gly–X–Y donde X es a menudo Pro e Y es a menudo 4-Hyp. Sólo los residuos de Gly pueden acomodarse en las estrechas uniones entre las cadenas α individuales (Fig. 4–11d). Los residuos de Pro y de 4-Hyp permiten el marcado giro de la hélice del colágeno. La secuencia de aminoácidos y la estructura cuaternaria superhelicoidal del colágeno permiten un estrecho empaquetamiento de sus tres polipéptidos. La 4-hidroxiprolina juega un papel especial en la estructura del colágeno y en la historia de la humanidad (Recuadro 4–3).

El estrecho empaquetamiento de las cadenas α en la triple hélice del colágeno proporciona más fuerza de tensión que un cable de acero de idéntica sección. Las fibrillas de colágeno **(Fig. 4–12)** son entramados supramoleculares constituidos por una triple hélice de moléculas de colágeno (denominadas a

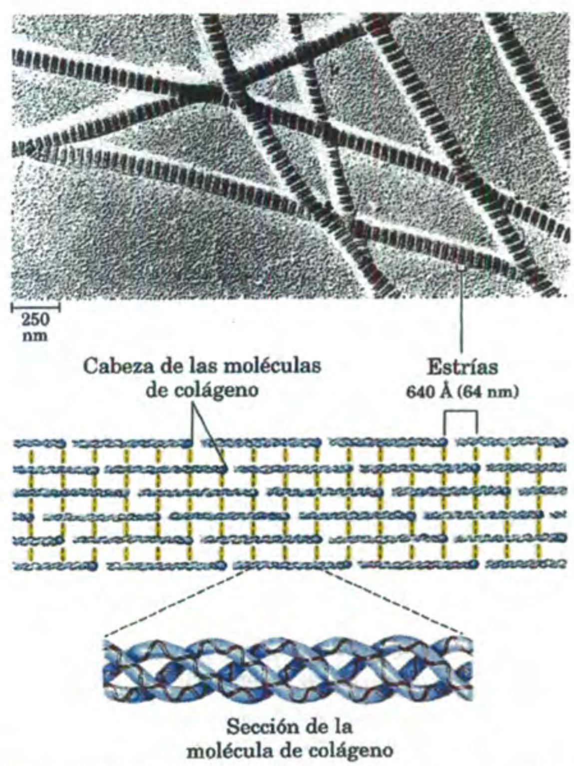


FIGURA 4–12 Estructura de las fibrillas del colágeno. El colágeno (M_r 300.000) es una molécula en forma de vara, de aproximadamente 3.000 Å de longitud y solamente 15 Å de grosor. Sus tres cadenas α enrolladas pueden tener secuencias diferentes pero cada una de ellas tiene aproximadamente 1.000 residuos aminoácidos. Las fibrillas de colágeno se forman a partir de moléculas de colágeno alineadas de manera escalonada y entrecruzadas para tener fuerza. El alineamiento específico y el grado de entrecruzamiento varía con el tejido y origina las estrías características en las micrografías electrónicas. En el ejemplo aquí mostrado, el alineamiento de los grupos de cabeza de cada cuarta molécula produce estrías distantes 640 Å (64 nm) entre ellas.

RECUADRO 4-3 MEDICINA Razones por las que marineros, exploradores y estudiantes deben consumir frutas y verduras frescas

... con la mala fortuna de que, además de la insalubridad del país en el que no cae nunca una gota de agua, fuéramos atacados por una "enfermedad de campo" que hacía que la carne de nuestras extremidades se arrugara y que la piel de nuestras piernas quedara cubierta de manchas negras de aspecto mohoso, como una bota vieja, que las encías de los enfermos quedaran en carne viva; y ninguno escapó de la enfermedad si no era para caer en las garras de la muerte. La señal era ésta: cuando la nariz empezaba a sangrar, la muerte estaba próxima...

—Memorias de Lord of Joinville, *ca. 1300*

Este extracto describe la inquietante situación del ejército de Luis IX hacia el fin de la Séptima Cruzada (1248–1254), cuando el ejército de los cruzados, debilitado por el escorbuto, fue destruido por los egipcios. ¿Cuál era la naturaleza de la enfermedad que afectaba a los soldados del siglo XIII?

El escorbuto está causado por una deficiencia en vitamina C o ácido ascórbico (ascorbato). La vitamina C es necesaria para, entre otras cosas, la hidroxilación de prolinas y lisinas del colágeno; el escorbuto es una enfermedad carencial caracterizada por la degeneración general del tejido conjuntivo. Entre las manifestaciones del escorbuto en estado avanzado se incluyen numerosas pequeñas hemorragias debidas a la fragilidad de los vasos sanguíneos, pérdida de dientes, cicatrización deficiente de las heridas y reapertura de heridas antiguas, dolor y degeneración de huesos y, finalmente, paro cardíaco. También se observa decaimiento e hipersensibilidad a muchos tipos de estímulos. Los casos más leves de carencia de vitamina C se acompañan de fatiga, irritabilidad y un aumento de la gravedad de las infecciones del tracto respiratorio. Muchos animales son capaces de sintetizar grandes cantidades de vitamina C mediante la conversión de glucosa en ascorbato a través de cuatro reacciones enzimáticas. Pero los seres humanos y algunos otros animales como gorilas, cobayas y murciélagos han perdido el último enzima de la serie a lo largo de la evolución y deben obtener su ascorbato de la dieta. La vitamina C se encuentra en muchas frutas y verduras. No obstante, y hasta el 1800, a menudo se encontraba ausente de los alimentos desecados o de otro tipo almacenados durante el invierno y durante viajes de larga duración.

El escorbuto fue observado por los egipcios en el 1500 a.C. y se encuentra descrito en los documentos de Hipócrates del siglo V a.C. A pesar de sus críticos efectos en las guerras medievales y de su aparición repetida en los inviernos de los climas nórdicos, su existencia no fue conocida popularmente hasta la época de las navegaciones de los descubridores europeos entre 1500 y 1800. La primera circunnavegación del globo, comandada por Fernando de Magallanes (1520) supuso la pérdida del 80% de la tripulación a causa del escorbuto. Vasco de Gama perdió a dos tercios de su tripulación durante la primera exploración de las rutas comerciales de la India (1499). Durante el segundo viaje de Jacques Cartier para explorar el río San Lorenzo (1535–1536), su expedición estuvo amenazada de completo desastre hasta que los nativos americanos les enseñaron a elaborar el té de cedro que curaba y prevenía el escorbuto (puesto que contenía vitamina C). Los brotes de escorbuto invernales fueron desapareciendo paulatinamente en Europa a lo largo del siglo XIX al irse extendiendo el cultivo de la patata, introducida desde Sudamérica.

En 1747, James Lind, un médico escocés de la Armada Británica, llevó a cabo el primer estudio clínico controlado de la historia. Durante un largo viaje en el buque de guerra de 50 cañones *HMS Salisbury*, Lind seleccionó doce marineros que sufrían de escorbuto y los separó en grupos de dos. Los doce recibieron la misma dieta, con la excepción de que cada grupo recibió un remedio distinto para el escorbuto de entre los que se hallaban entonces descritos. Aquellos que recibieron limones y naranjas se recuperaron y volvieron al trabajo. Los que recibieron zumo de manzana hervido mejoraron ligeramente, mientras que el resto continuó su deterioro. El *Tratado sobre el escorbuto* de Lind se publicó en 1753, pero la Armada Británica siguió ignorando la enfermedad durante otros 40 años. En 1795 el almirantazgo británico ordenó proporcionar una ración de zumo de lima o limón concentrado a todos los marineros británicos (y de ahí su sobrenombre "limeys"). El escorbuto continuó siendo un problema en otras partes del mundo hasta 1932, cuando el científico húngaro Albert Szent-Györyi junto con W.A. Waugh y C.G. King de la Universidad de Pittsburgh aislaron y sintetizaron el ácido ascórbico.

James Lind, 1716–1794; médico naval, 1739–1748

El ácido L-ascórbico, o vitamina C, es un polvo cristalino blanco e inodoro. Es muy soluble en agua y relativamente insoluble en disolventes orgánicos. En estado seco y protegido de la luz es estable durante prolongados períodos de tiempo. La ración diaria recomendada de vitamina C es de 60 mg en Estados Unidos (Australia y el Reino Unido recomiendan de 30 a 40 mg; Rusia recomienda 100 mg). Además de los cítricos y casi todas las frutas frescas, los pimientos, tomates, patatas y brécol son buenas fuentes de vitamina C. La vitamina C de las frutas y verduras se destruye con la cocción excesiva o un almacenamiento muy prolongado.

¿Cuál es la razón de que el ascorbato sea necesario para la salud? Aquí nos interesa específicamente su papel en la formación del colágeno. Como se ha comentado en el texto, el colágeno se construye a partir de un tripéptido repetido de Gly–X–Y, donde X e Y son generalmente Pro o 4-Hyp, el derivado de la prolina (4*R*)-L-hidroxiprolina, que juega un papel esencial en el plegamiento del colágeno y en el mantenimiento de su estructura. El anillo de prolina se encuentra normalmente como una mezcla de dos conformaciones no planas denominadas C_γ-endo y C_γ-exo (Fig. 1). La estructura de la hélice del colágeno exige que los residuos Pro en las posiciones Y estén en la conformación C_γ-exo, y ésta es la conformación forzada por la hidroxi-

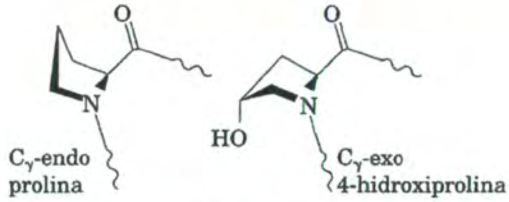


FIGURA 1 Las conformaciones C_γ-endo de la prolina y C_γ-exo de la 4-hidroxiprolina.

lación en C-4 de la 4-hidroxiprolina. Sin embargo, la misma estructura exige que los residuos Pro en la posición X estén en la conformación C_γ-endo, y la introducción de 4-Hyp en esta posición podría desestabilizar la hélice. La incapacidad de hidroxilar Pro en posición Y en ausencia de vitamina C provoca la inestabilidad del colágeno y los problemas de tejido conjuntivo observados en el escorbuto.

La hidroxilación de residuos de Pro específicos en el procolágeno, el precursor del colágeno, necesita la acción del enzima prolil 4-hidroxilasa. Este enzima (M_r 240.000) se encuentra como un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ en todos los vertebrados. La actividad hidroxilante de prolinas reside en la subunidad α. Cada subunidad α contiene un átomo de hierro no hemo (Fe^{2+}), y el enzima pertenece a una clase de hidroxilasas que requieren α-cetoglutarato en su reacción.

En la reacción normal de la prolil 4-hidroxilasa (Fig. 2a), una molécula de α-cetoglutarato y una de O_2 se unen al enzima. El α-cetoglutarato se descarboxila oxidativamente formando CO_2 y succinato. El átomo de oxígeno restante se utiliza para hidroxilar un residuo Pro específico del procolágeno. En esta reacción no es necesario el ascorbato. Sin embargo, la prolil 4-hidroxilasa también cataliza una reacción de descarboxilación oxidativa del α-cetoglutarato que no está acoplada a la hidroxilación de prolina (Fig. 2b). Durante esta reacción, el Fe^{2+} se oxida, inactivando el enzima y haciéndolo incapaz de hidroxilar prolina. El ascorbato consumido en la reacción es necesario para reducir el átomo de hierro, lo que permite la recuperación de la actividad catalítica.

El escorbuto sigue siendo un problema hoy en día. La enfermedad se encuentra no sólo en lugares remotos con problemas de nutrición, sino, sorprendentemente, también en los campus universitarios americanos. Las únicas verduras consumidas por algunos estudiantes son los de alguna esporádica ensalada y pasan días sin que estos jóvenes adultos consuman fruta. Un estudio de 1998 entre 230 estudiantes de la Universidad del Estado de Arizona reveló que el 10% sufría una carencia seria de vitamina C, y 2 de ellos presentaban un nivel tan bajo que probablemente padecían escorbuto. Tan sólo la mitad de los estudiantes del estudio consumían la cantidad diaria recomendada de vitamina C.

¡Tómense sus verduras y sus frutas frescas!

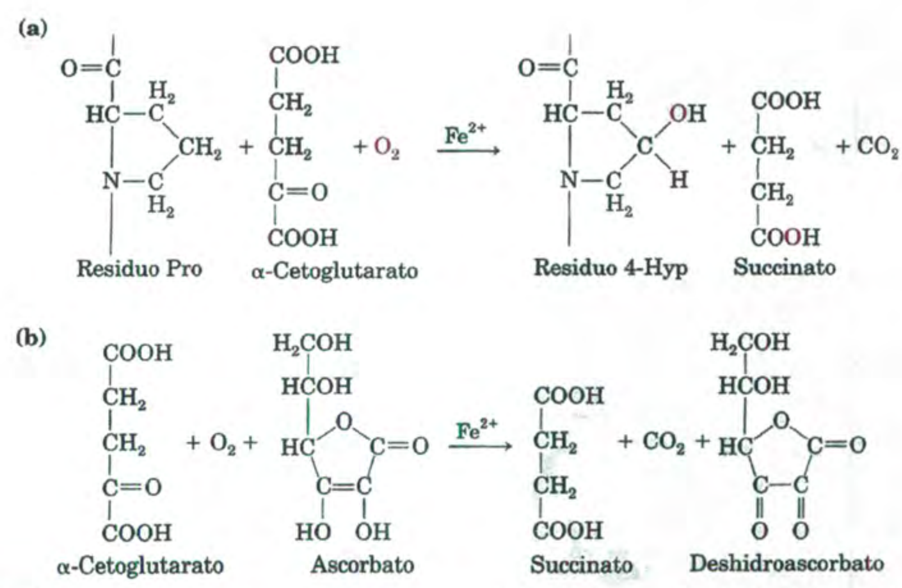
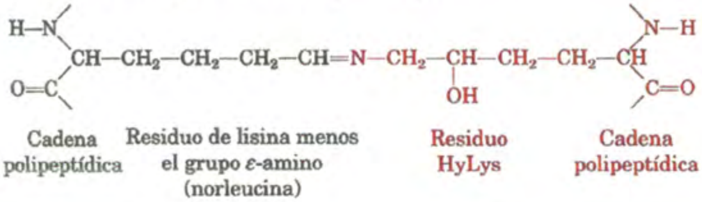


FIGURA 2 Reacciones catalizadas por la prolil 4-hidroxilasa. **(a)** La reacción normal, acoplada a la hidroxilación de prolina, no requiere ascorbato. En rojo se muestra el destino de los dos átomos de oxígeno del O_2. **(b)** La reacción desacoplada, en la que el α-cetoglutarato se descarboxila oxidativamente sin hidroxilación de la prolina. El ascorbato se consume estequiométricamente en esta reacción al convertirse en deshidroascorbato.

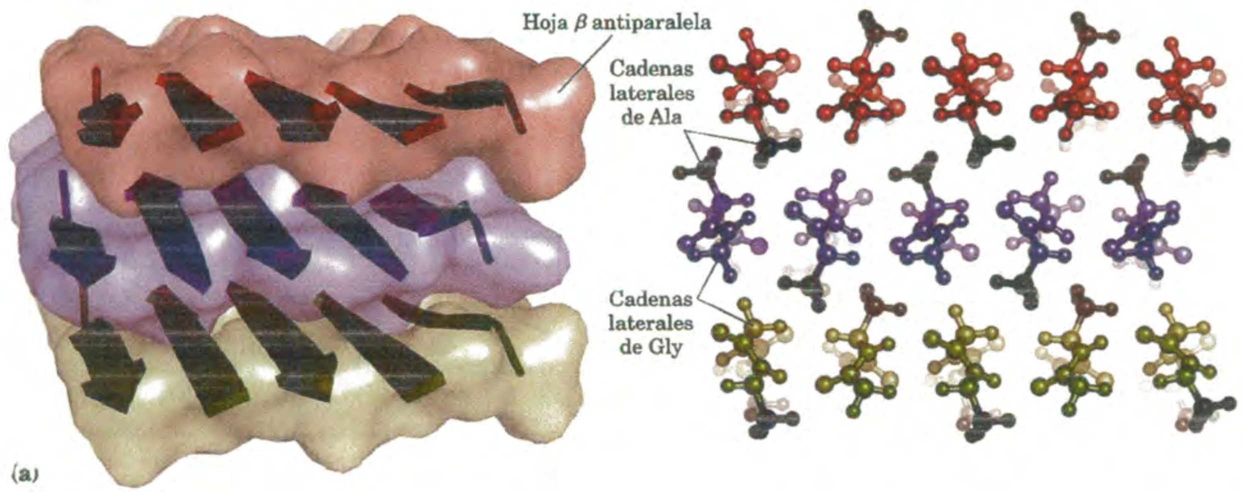
veces moléculas de tropocolágeno) asociadas en una variedad de formas que proporcionan diferentes grados de fuerza de tensión. Las cadenas α de las moléculas de colágeno y las moléculas de colágeno de las fibrillas están entrecruzadas por enlaces covalentes poco habituales en los que intervienen residuos de Lys, HyLys (5-hidroxilisina; véase la Fig. 3–8a) o His presentes en algunas de las posiciones X o Y. Estas uniones dan lugar a residuos aminoácidos no estándar tales como la deshidrohidroxilisinonorleucina. La rigidez y la fragilidad cada vez mayores del tejido conjuntivo en las personas de mayor edad son el resultado de la acumulación de entrecruzamientos covalentes en las fibrillas de colágeno a medida que envejecemos.



Deshidrohidroxilisinonorleucina

Un mamífero típico posee más de 30 variedades estructurales diferentes de colágeno localizadas en diferentes tejidos; cada una de ellas difiere ligeramente en secuencia y función. Algunos defectos genéticos humanos en la estructura del colágeno ilustran la íntima relación existente entre la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional en esta proteína. La osteogénesis imperfecta da como resultado la formación anormal de los huesos en bebés; el síndrome de Ehlers-Danlos produce debilidad en las articulaciones. Ambas enfermedades pueden ser letales y ambas son el resultado de la sustitución de un residuo aminoácido con un grupo R grande Cys o Ser en lugar de una Gly en cada cadena α (un residuo Gly diferente en cada caso). Estas sustituciones de un solo residuo tienen un efecto catastrófico sobre la función del colágeno, pues destruyen la estructura repetitiva Gly—X—Y que confiere al colágeno su estructura halicoidal única. La glicina, debido a su papel en la triple hélice del colágeno (Fig. 4–11d), no puede ser sustituida por ningún otro residuo aminóacido sin un efecto perjudicial en la estructura. ■

Fibroína de la seda La fibroína, la proteína de la seda, es producida por los insectos y las arañas. Sus cadenas polipeptídicas están predominantemente en conformación β. La fibroína es rica en residuos de Ala y Gly, lo que permite un empaquetamiento compacto de las hojas β y una disposición entrelazada de los grupos R **(Fig. 4–13)**. El uso exhaustivo de la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno entre todas las uniones peptídicas de los polipéptidos de cada hoja β y la optimización de las interacciones de van der Waals entre las hojas, estabilizan la estructura global. La seda no se estira, ya que la conformación β ya está altamente extendida (Fig. 4–6). Sin embargo, la estructura es flexible debido a que las hojas se mantienen unidas mediante numerosas interacciones débiles en lugar de por enlaces covalentes como los puentes disulfuro de las α-queratinas.



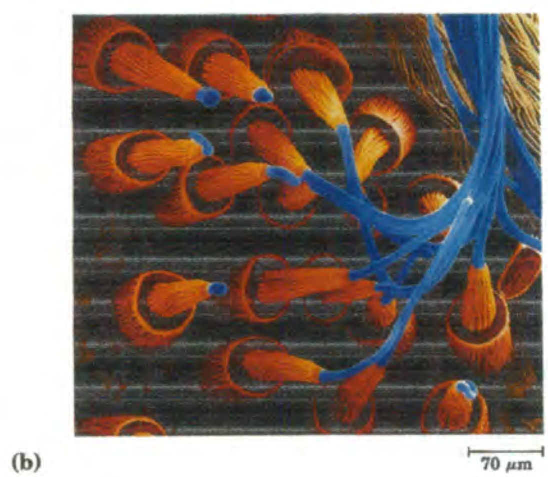


FIGURA 4–13 Estructura de la seda. Las fibras de un tejido de seda o de una telaraña están constituidas por la proteína fibroína. **(a)** La fibroína consiste en capas de hojas β antiparalelas ricas en residuos de Ala y Gly. Como se muestra en esta representación de bolas y varillas, las cadenas laterales pequeñas están interdigitadas, permitiendo un empaquetamiento compacto en cada capa. **(b)** En la micrografía electrónica coloreada las hebras de fibroína (azul) salen de las fúsulas de una araña.

RECUADRO 4–4 El banco de datos de estructura de proteínas (Protein Data Bank, PDB)

El número de proteínas de las que se conoce hoy día la estructura tridimensional es del orden de decenas de miles y esta cantidad se multiplica por dos o más cada dos años. Esta enorme cantidad de información está revolucionando nuestro conocimiento sobre la estructura de proteínas, la relación estructura-función y los caminos evolutivos por los que las proteínas adquirieron su estructura actual, deducibles a partir de las relaciones dentro de familias estructurales que salen a la luz al analizar y seleccionar la información de las bases de datos. Uno de los recursos más importantes a disposición de los bioquímicos es el **Protein Data Bank** (banco de datos de proteínas, **PDB;** www. rcsb.org).

El PDB es un archivo de estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas determinadas experimentalmente, que contiene prácticamente todas las estructuras macromoleculares (proteínas, RNA, DNA, etc.) elucidadas hasta la fecha. A cada estructura se le asigna una etiqueta identificadora (un identificador de cuatro letras denominado PDB ID). Estas etiquetas se pueden ver en todos los pies de figura correspondientes a las ilustraciones de este libro en las que hay estructuras derivadas del PDB, con el fin de que profesores y estudiantes puedan explorarlas por su cuenta. Los archivos de datos del PDB describen las coordenadas espaciales de todos los átomos para los que se ha determinado su posición (muchas de las estructuras catalogadas no son completas). Otros archivos adicionales proporcionan información acerca de los métodos de determinación estructural y de la precisión, o resolución, de la estructura. Las coordenadas atómicas se pueden convertir en una imagen de la macromolécula utilizando los programas de visualización adecuados. Animamos a los estudiantes a acceder al PDB y explorar las estructuras utilizando el software de visualización que ofrece la propia base de datos. También es posible extraer una copia de los archivos de estructuras para explorarlas en el propio ordenador mediante software libre como RasMol, Protein Explorer o FirstGlance in Jmol, disponibles en www.umass.edu/microbio/rasmol.

En las proteínas globulares la diversidad estructural refleja la diversidad funcional

En las proteínas globulares los diferentes segmentos de una cadena polipeptídica (o de múltiples cadenas polipeptídicas) se pliegan unos sobre otros, generando unas formas mucho más compactas que las que hemos visto en las proteínas fibrosas **(Fig. 4–14)**. El plegamiento proporciona también la diversidad estructural necesaria para que las proteínas puedan llevar a término una amplia variedad de funciones biológicas. Entre las proteínas globulares se incluyen enzimas, proteínas de transporte, proteínas motoras, proteínas reguladoras, inmunoglobulinas y proteínas con muchas otras funciones.

Nuestra discusión acerca de las proteínas globulares comienza con los principios extraídos de las primeras estructuras proteicas elucidadas. A ésta le seguirá una descripción detallada de las subestructuras proteicas y una categorización comparativa. Este tipo de discusión sólo es posible gracias a la gran cantidad de información disponible en Internet a través de bases de datos de acceso público, en particular del Protein Data Bank (Recuadro 4–4).

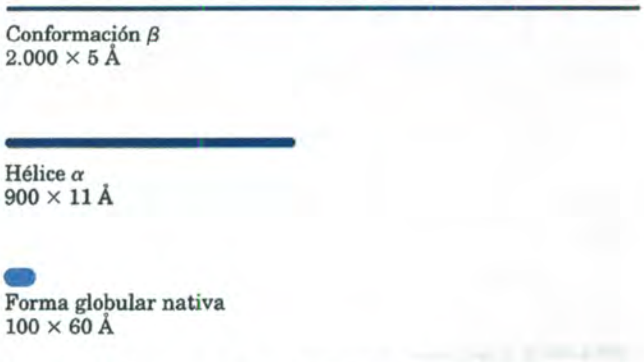


FIGURA 4–14 Las estructuras de las proteínas globulares son compactas y variadas. La albúmina sérica humana (M_r 64.500) tiene 585 residuos en una sola cadena. En esta figura se muestran las dimensiones aproximadas de esta cadena polipeptídica sencilla, en el caso de que toda ella se hallara en la conformación extendida β o en hélice α. También se muestra el tamaño real de la proteína en su forma globular nativa, deducida a partir de cristalografía de rayos X; la cadena polipeptídica debe encontrarse compactamente plegada para poder adoptar estas dimensiones.

La mioglobina proporcionó las primeras claves acerca de la complejidad de las estructuras proteicas globulares

Arquitectura de proteínas –Estructura terciaria de proteínas globulares pequeñas, II. Mioglobina El primer avance decisivo en la comprensión de la estructura tridimensional de las proteínas globulares se produjo gracias a los estudios de difracción de rayos X con la mioglobina, llevados a cabo por John Kendrew y colaboradores en la década de 1950. La mioglobina es una proteína fijadora de oxígeno relativamente pequeña (M_r 16.700), que se encuentra en las células musculares. Su función es almacenar y facilitar la difusión del oxígeno en el músculo en rápida contracción. La mioglobina está formada por una única cadena polipeptídica de 153 residuos aminoácidos de secuencia conocida y por un solo grupo ferroprotoporfirina o hemo. En la hemoglobina, la proteína fijadora de oxígeno de los eritrocitos, se encuentra un grupo hemo idéntico; es el responsable del color rojo amarronado oscuro de la mioglobina y de la hemoglobina. La mioglobina es muy abundante en los músculos de los mamíferos buceadores tales como la ballena, la foca y la marsopa, cuyos músculos son tan ricos en esta proteína que tienen un color marrón. El almacenamiento y distribución de oxígeno por la mioglobina muscular les permite permanecer sumergidos durante largos períodos de tiempo. La actividad de la mioglobina y de otras moléculas de globina se investigan con más detalle en el Capítulo 5.

En la **Figura 4–15** se muestran varias representaciones estructurales de la mioglobina que ilustran la manera en que se pliega la cadena polipeptídica en tres dimensiones, su estructura terciaria. El grupo en rojo rodeado por la proteína es el hemo. El esqueleto polipeptídico de la molécula de mioglobina está

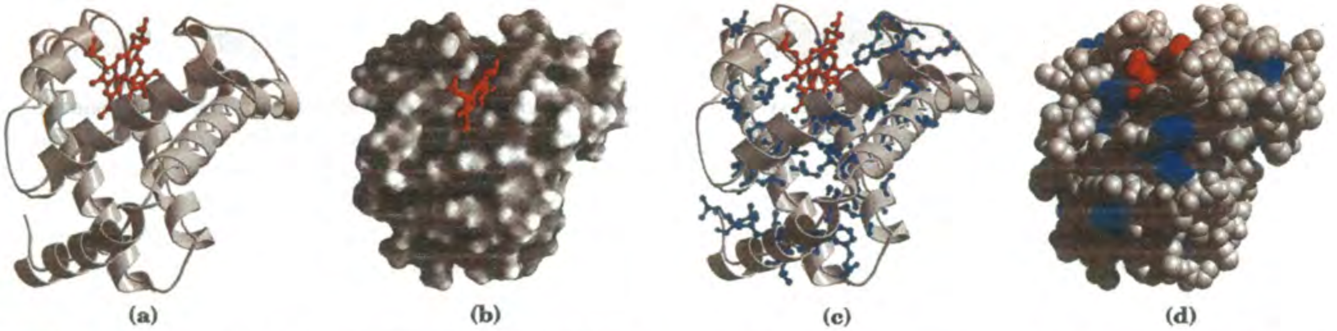


FIGURA 4–15 Estructura terciaria de la mioglobina de cachalote. (PDB ID 1MBO) La orientación de la proteína es la misma en todas las figuras; el grupo hemo se muestra en rojo. Además de ilustrar la estructura de la mioglobina, esta figura proporciona ejemplos sobre las diferentes maneras de representar la estructura de una proteína. **(a)** El esqueleto polipeptídico se muestra en una representación de cintas del tipo introducido por Jane Richardson, que destaca las regiones de estructura secundaria. Las regiones en hélice α se observan con claridad. **(b)** Imagen del contorno de la superficie de la proteína; resulta útil para visualizar las bolsas donde pueden unirse otras moléculas. **(c)** Representación de cintas que incluye las cadenas laterales (en azul) de los residuos hidrofóbicos Leu, Ile, Val y Phe. **(d)** Modelo espacial con todas las cadenas laterales de los aminoácidos. Cada átomo está representado por una esfera que abarca su radio de van der Waals. La mayor parte de los residuos hidrofóbicos (también en azul) no son visibles, debido a que están sepultados en el interior de la proteína.

formado por ocho segmentos relativamente rectos de hélice α, conectados por giros, algunos de los cuales son giros β. La hélice α de mayor longitud tiene 23 residuos aminoácidos y la más corta solamente 7; todas ellas son dextrógiras. En las regiones helicoidales se encuentran más del 70% de los aminoácidos de la molécula de mioglobina. El análisis por rayos X reveló la posición precisa de cada uno de los grupos R, que ocupan prácticamente todo el espacio contenido dentro de los límites de la cadena plegada.

A partir de la estructura de la mioglobina se extrajeron muchas conclusiones importantes. La posición de las cadenas laterales de los aminoácidos indica que la estructura debe gran parte de su estabilidad a las interacciones hidrofóbicas. La mayor parte de los grupos R hidrofóbicos se hallan situados en el interior de la molécula de mioglobina, lejos del contacto con el agua. Todos los grupos R polares, excepto dos, se encuentran en la superficie externa de la molécula, y todos ellos están hidratados. La molécula de mioglobina es tan compacta que en su interior solamente hay espacio para cuatro moléculas de agua. Este denso núcleo hidrofóbico es típico de las proteínas globulares. La fracción de espacio ocupada por los átomos en un líquido orgánico oscila entre 0,4 y 0,6. En una proteína globular este valor está alrededor de 0,75, comparable al de un cristal (en un cristal típico la fracción está entre 0,70 y 0,78, cercana al máximo teórico). En un entorno tan estrechamente empaquetado, las interacciones débiles se refuerzan y potencian mutuamente. Por ejemplo, las cadenas laterales apolares del núcleo se encuentran tan cercanas que las interacciones de van der Waals de corto alcance contribuyen significativamente a las interacciones hidrofóbicas estabilizantes.

La deducción de la estructura de la mioglobina confirmó algunas expectativas y a la vez introdujo algunos nuevos elementos de estructura secundaria. Como predijeron Pauling y Corey, todos los enlaces peptídicos se hallan en la configuración plana trans. Las hélices α de la mioglobina proporcionaron la primera prueba experimental directa de la existencia de este tipo de estructura secundaria. Tres de los cuatro residuos Pro de la mioglobina se encuentra en giros de la cadena. El cuarto residuo de Pro se encuentra en una hélice α donde origina la curvatura necesaria para un empaquetamiento compacto de la hélice.

El grupo hemo plano está situado en una hendidura o bolsa de la molécula de mioglobina. El átomo de hierro del centro del grupo hemo tiene dos posiciones de enlace (de coordinación) perpendiculares al plano del hemo **(Fig. 4–16)**. Una de estas posiciones se une al grupo R de un residuo de His en la posición 93; la otra posición es el sitio donde se une una molécula de O_2. La accesibilidad del grupo hemo al disolvente está muy restringida en el interior de esta bolsa. Este hecho es muy importante para la función, puesto que los grupos hemo libres en una disolución oxigenada se oxidan rápidamente, pasando de la forma ferrosa (Fe^{2+}), activa en la unión reversible de O_2, a la forma férrica (Fe^{3+}), que no es capaz de fijar O_2.

Se ha determinado la estructura de muchas mioglobinas diferentes, lo que ha permitido observar los cambios estructurales

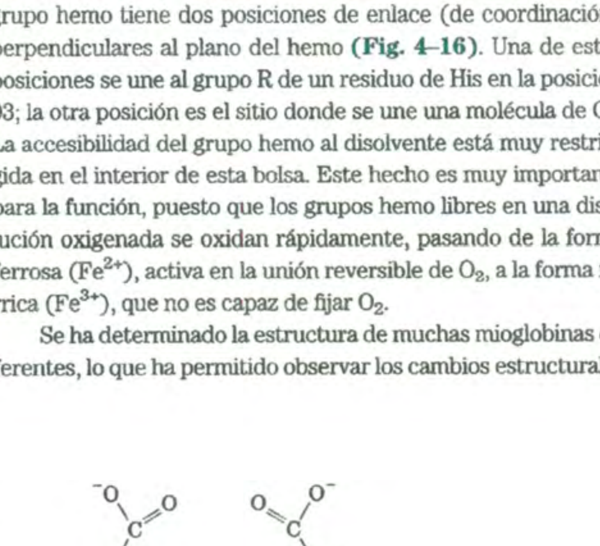


FIGURA 4–16 El grupo hemo. Este grupo está presente en la mioglobina, hemoglobina, citocromos y muchas otras proteínas (las hemoproteínas). **(a)** El hemo está formado por un anillo orgánico complejo, la protoporfirina, a la que se une un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}). El átomo de hierro tiene seis enlaces de coordinación, cuatro en el plano de la molécula plana de porfirina y unidos a ella, y dos perpendiculares a la misma. **(b)** En la mioglobina y en la hemoglobina, uno de los enlaces de coordinación perpendiculares está unido a un nitrógeno de un residuo de His. El otro se encuentra "abierto" y sirve como sitio de unión para una molécula de O_2.

producidos por la unión de oxígeno o de otras moléculas y comprender, por primera vez, la correlación entre estructura y función proteica. Desde entonces cientos de proteínas han sido sometidas a un análisis similar. Hoy en día, técnicas tales como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y otras complementan los datos de difracción de rayos X, proporcionando más información sobre la estructura de una proteína (Recuadro 4–5, p. 132). Además, la secuenciación del DNA genómico de muchos organismos (Capítulo 9) ha permitido identificar miles de genes que codifican proteínas de secuencia conocida pero función todavía desconocida; el trabajo en este campo continúa a ritmo acelerado.

Las proteínas globulares tienen estructuras terciarias diversas

Como consecuencia de la elucidación de las estructuras terciarias de cientos de proteínas globulares, es evidente que la mioglobina representa solamente una de las muchas posibilidades de plegamiento de una cadena polipeptídica. En la Tabla 4–3 se muestran las proporciones de las conformaciones α y β (en porcentaje de residuos en cada tipo de plegamiento) de varias proteínas pequeñas, globulares y de cadena única. Cada una de estas proteínas tiene una estructura específica y adaptada a su función biológica particular, pero todas ellas comparten propiedades importantes con la mioglobina. Todas tienen un plegamiento compacto y en todas ellas las cadenas laterales hidrofóbicas están orientadas hacia el interior (evitando el contacto con el agua) y las cadenas laterales hidrofílicas se hallan en la superficie. Las estructuras están también estabilizadas por multitud de enlaces de hidrógeno y por algunas interacciones iónicas.

Para el principiante, la complejidad de las estructuras terciarias de proteínas globulares, algunas mucho más grandes que la mioglobina, se aprecia y se describe mejor en base a los patrones estructurales comunes que aparecen una y otra vez en proteínas diferentes y a menudo no relacionadas. La estructura tridimensional de una proteína globular típica se puede considerar como un conjunto de segmentos polipeptídicos en conformaciones de hélice α y hoja β unidas por segmentos de conexión. La estructura se puede describir mediante la forma en que se apilan estos segmentos así como por la disposición de los segmentos que los conectan.

Para comprender una estructura tridimensional completa necesitamos analizar sus patrones de plegamiento. Empezaremos por definir dos términos importantes que describen los patrones o elementos estructurales de una cadena polipeptídica para continuar con las reglas de plegamiento.

El primero de estos términos es **motivo,** también llamado **estructura supersecundaria** o simplemente **plegamiento.** Un motivo es simplemente un patrón de plegamiento reconocible que incluye dos o más elementos de estructura secundaria y las conexiones entre ellos. A pesar de que en la literatura existe cierta confusión acerca de la aplicación de estos tres términos, generalmente se usan de manera indistinta. Un motivo puede ser muy simple, como en el caso de dos elementos de estructura secundaria plegados uno sobre el otro, y representar sólo una pequeña parte de la proteína. Un ejemplo es el **lazo β-α-β (Fig. 4–17a).** También puede tratarse de una estructura muy elaborada que incluya un buen número de segmentos de la proteína que se pliegan conjuntamente, como en el barril β (Fig. 4–17b). En algunos casos, un único motivo grande puede incluir toda la proteína. El término abarca cualquier patrón de plegamiento favorable y resulta útil para describir dichos patrones. El segmento definido como motivo puede ser estable de forma independiente o no. Ya hemos visto un motivo bien estudiado, la superhélice (coiled coil) de la α-queratina, que también se encuentra en otras proteínas. Obsérvese que un motivo no es un elemento estructural jerárquico ubicado entre las estructuras secundaria y terciaria. Es un patrón de plegamiento que describe una pequeña parte de una proteína o una cadena polipeptídica entera. Por esta razón, el término sinónimo "estructura supersecundaria" genera confusión a veces al sugerir el concepto de jerarquía.

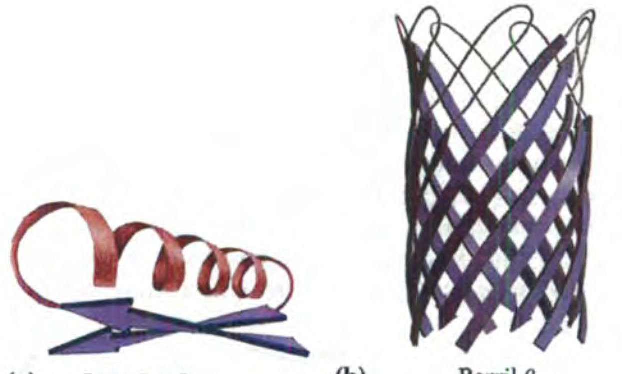
El segundo término utilizado para describir patrones estructurales es **dominio.** Un dominio es, según la definición de

TABLA 4–3 Proporciones aproximadas de hélice α y conformación β en algunas proteínas monocadena

	Residuos (%)*	
Proteína (residuos totales)	**Hélice α**	**Conformación β**
Quimotripsina (247)	14	45
Ribonucleasa (124)	26	35
Carboxipeptidasa (307)	38	17
Citocromo *c* (104)	39	0
Lisozima (129)	40	12
Mioglobina (153)	78	0

Fuente: Datos extraídos de Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry*, Part I: *The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W. H. Freeman and Company, New York.

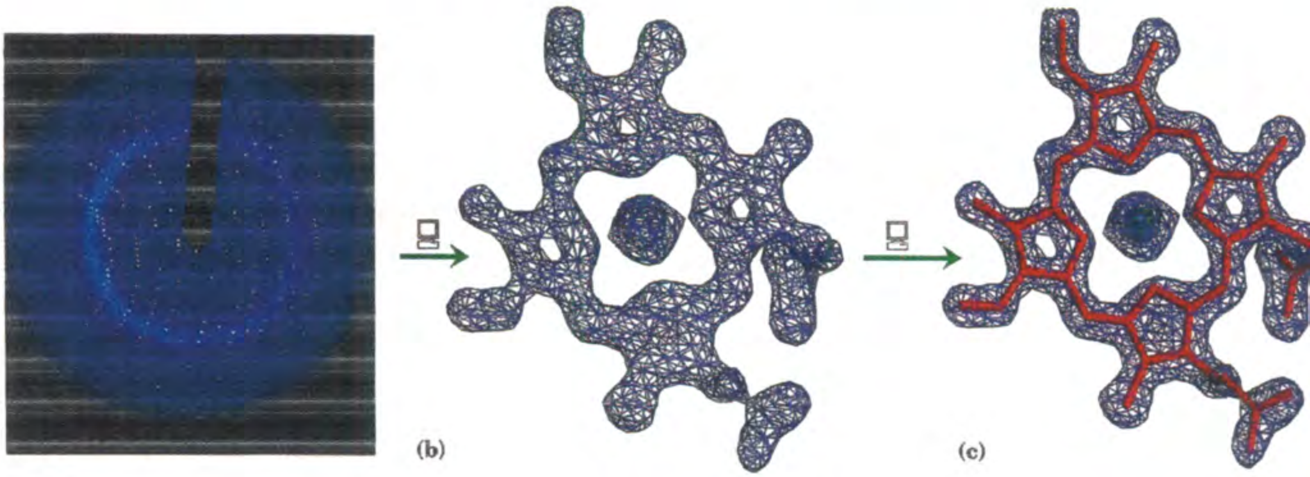
*Las partes de las cadenas polipeptídicas no plegadas en hélice α o conformación β consisten en giros y fragmentos extendidos o plegados irregularmente. Los segmentos en hélice α o conformación β a veces se desvían ligeramente de sus dimensiones y geometría normales.



(a) Lazo β-α-β (b) Barril β

FIGURA 4–17 Motivos. (a) Un motivo simple, el lazo β-α-β. (b) Un motivo más elaborado, el barril β. Este barril β es un único dominio de la α-hemolisina (una toxina que mata las células al crear un agujero en su membrana) de la bacteria *Staphylococcus aureus* (del PDB ID 7AHL).

RECUADRO 4-5 MÉTODOS **Métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína**



(a) (b) (c)

Difracción de rayos X

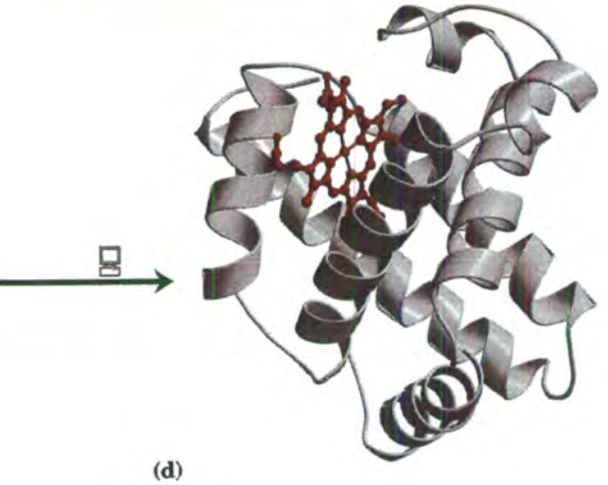
El espaciado entre átomos de una red cristalina puede determinarse midiendo la localización y la intensidad de las manchas producidas en una película fotográfica por un haz de rayos X de longitud de onda conocida después de ser difractado por los electrones de los átomos. Por ejemplo, el análisis por rayos X de cristales de NaCl demuestra que los iones Na^+ y Cl^- están distribuidos en una red cúbica sencilla. Los métodos de difracción de rayos X también permiten estudiar el espaciado de diferentes tipos de átomos en moléculas orgánicas complejas, incluso tan grandes como las proteínas. Sin embargo, la técnica para analizar cristales de moléculas complejas es mucho más difícil que para la sal. Cuando el patrón repetitivo del cristal es una molécula tan grande como, por ejemplo, una proteína, el gran número de átomos de la molécula da lugar a millares de señales de difracción que deben analizarse por ordenador.

Consideremos el modo en que se generan las imágenes en un microscopio óptico. La luz emitida desde una fuente puntual se enfoca sobre un objeto. Las ondas luminosas son dispersadas por el objeto y recombinadas por una serie de lentes que generan una imagen aumentada del objeto. El tamaño menor de un objeto cuya estructura puede determinarse mediante este sistema (el poder resolutivo del microscopio) viene determinado por la longitud de onda de la luz, en este caso luz visible con longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nm. Los objetos menores que la mitad de la longitud de onda de la luz incidente no pueden ser resueltos. Para resolver objetos tan pequeños como las proteínas, son necesarios los rayos X, cuyas longitudes de onda se encuentran en el intervalo de 0,7 a 1,5 Å (0,07 a 0,15 nm). No existen, sin embargo, lentes que puedan recombinar los rayos X para formar una imagen; en su lugar el patrón de difracción de los rayos X se recoge directamente y a continuación se convierte en una imagen mediante técnicas matemáticas.

La cantidad de información obtenida mediante cristalografía de rayos X depende del grado de orden estructural de la muestra. A partir de los primeros estudios de los patrones de difracción de proteínas fibrosas que presentan una ordenación regular en cabellos y lana se obtuvieron algunos parámetros estructurales importantes. Sin embargo, los haces ordenadamente formados por proteínas fibrosas no son cristales, las moléculas se disponen una al lado de otra pero no todas están orientadas en la misma dirección. La obtención de información estructural tridimensional más detallada hace necesario partir de cristales de proteína altamente ordenados. No se conocen aún las estructuras de muchas proteínas importantes, simplemente por la dificultad en cristalizarlas. Los que trabajan en ello han comparado la dificultad de obtener cristales de proteína con la de conseguir mantener pelotas del juego de bolos unidas con cinta adhesiva.

Operativamente, se pueden distinguir diferentes etapas en el análisis estructural por rayos X (Fig. 1). Una vez se ha obtenido un cristal, se coloca en un haz de rayos X entre la fuente de rayos X y el detector y se genera un modelo regular de señales de difracción denominadas reflexiones. Las señales o puntos se generan por el haz de rayos X difractado, y cada uno de los átomos de la molécula contribuye en cada uno de los puntos. El patrón de difracción global de puntos da lugar a la construcción de un mapa de densidad electrónica de la proteína mediante una herramienta matemática llamada transformada de Fourier. A efectos prácticos es como si el ordenador actuara como una "lente informática". A continuación se construye un modelo de la estructura consistente con el mapa de densidad electrónica.

John Kendrew observó que el patrón de difracción de rayos X de la mioglobina cristalina (aislada de músculo de cachalote) es muy complejo, con unas 25.000 reflexiones. El estudio de éstas por ordenador se hizo en varias etapas. En cada una de ellas se mejoró la resolución, hasta que en 1959 pudieron determinarse las posiciones de casi todos los átomos (excluidos los de hidrógeno). La secuencia de aminoácidos obtenida por análisis químico coincidía con el modelo molecular. Desde entonces se han determinado las estructuras de miles de proteínas, muchas de ellas mucho más complejas que la mioglobina, con una resolución similar.



(d)

FIGURA 1 Etapas en la determinación de la estructura de la mioglobina de cachalote mediante cristalografía de rayos X. **(a)** Se generan patrones de difracción de rayos X a partir de un cristal de proteína. **(b)** Los datos extraídos de los patrones de difracción se utilizan para calcular el mapa tridimensional de densidad electrónica de la proteína. Se muestra la densidad electrónica de sólo una parte de la estructura, el hemo. **(c)** Las regiones con mayor densidad electrónica indican la localización de núcleos atómicos, y esta información se utiliza para recomponer la estructura final. Aquí se modeló la estructura del grupo hemo en el mapa de densidad electrónica. **(d)** La estructura completa de la mioglobina de cachalote, incluyendo el hemo (PDB ID 2MBW).

El entorno físico en el interior del cristal no es idéntico al de una solución o de una célula viva. Un cristal impone un espacio y un tiempo promedio en la estructura deducida de su análisis, y los estudios de difracción de rayos X aportan escasa información acerca de los movimientos moleculares en el interior de la proteína. La conformación de las proteínas en un cristal podría, en principio, verse también afectada por factores no fisiológicos tales como contactos proteína-proteína accidentales en el interior del cristal. Sin embargo, cuando se comparan las estructuras derivadas de los análisis cristalográficos con la información estructural obtenida con otros medios (como la RMN, que se describe a continuación), las estructuras derivadas del cristal casi siempre representan una conformación funcional de la proteína. La cristalografía de rayos X puede aplicarse de forma satisfactoria a proteínas demasiado grandes para ser analizadas estructuralmente por RMN.

Resonancia magnética nuclear

Una de las ventajas de los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) es que se realizan con las macromoléculas en solución, mientras que la cristalografía de rayos X está limitada a moléculas que pueden ser cristalizadas. La RMN incluso puede penetrar en la parte dinámica de la estructura de las proteínas, lo que incluye los cambios conformacionales, el plegamiento de la proteína y las interacciones con otras moléculas.

La RMN es una manifestación del momento angular de spin nuclear, una propiedad mecánico-cuántica del núcleo atómico. Sólo ciertos átomos poseen el tipo de spin nuclear que origina la señal de RMN, entre los que se incluyen ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F y ^{31}P, que poseen el tipo de spin nuclear que da lugar a la señal de RMN. El spin nuclear genera un dipolo magnético. Cuando a una disolución que contiene un solo tipo de macromolécula se le aplica un campo magnético intenso y estático, los dipolos magnéticos se alinean en el campo en una de dos orientaciones, paralela (energía baja) o antiparalela (energía alta). Se aplica un pulso breve (~10 μs) de energía electromagnética de una frecuencia adecuada (frecuencia de resonancia, dentro de la zona de radiofrecuencia) y en ángulo recto con los núcleos alineados en el campo magnético. Parte de la energía es absorbida debido al paso del núcleo al estado de energía elevada y el espectro de absorción resultante contiene información acerca de la identidad del núcleo y de su entorno químico inmediato. Para generar un espectro de RMN como el que muestra la Figura 2, se recogen los datos de muchos experimentos llevados a cabo sobre una muestra y se promedian, aumentando así la relación señal-ruido.

El ^{1}H es especialmente importante en los experimentos de RMN debido a su elevada sensibilidad y abundancia natural. El espectro de RMN ^{1}H puede llegar a ser muy complicado en el caso de las macromoléculas. Incluso una proteína pequeña tiene cientos de átomos ^{1}H, dando lugar a un espectro de RMN monodimensional demasiado complejo para analizar. El análisis estructural de proteínas fue posible con la llegada de las técnicas de RMN bidimensional (Fig. 3). Estos métodos permiten medir los acoplamientos dependientes de la distancia y a través del espacio de los spines nucleares en átomos cercanos (el efecto nuclear Overhauser (NOE), un método apodado NOESY) o el acoplamiento de spines nucleares de átomos conectados por enlaces covalentes (espectroscopia de correlación total, o TOCSY).

La traducción de un espectro bidimensional de RMN en una estructura tridimensional completa puede ser un proceso

(*continúa en la página siguiente*)

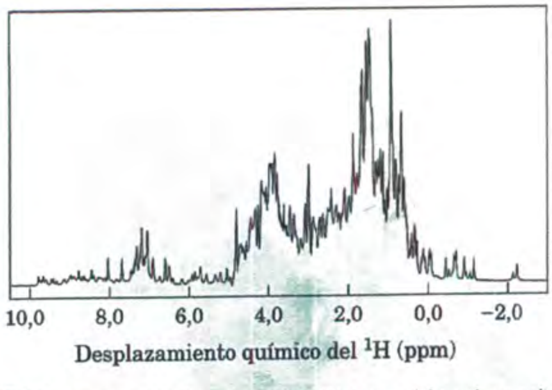


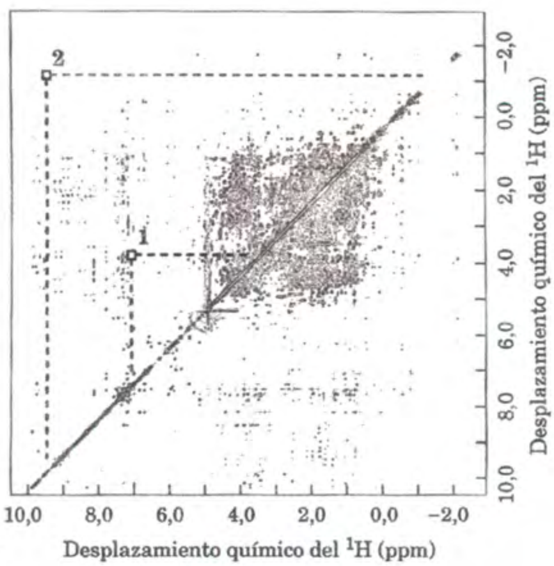
FIGURA 2 Espectro monodimensional de RMN de una globina de un poliqueto marino. Esta proteína y la mioglobina de cachalote son análogos estructurales muy cercanos, pertenecientes a la misma familia estructural de proteínas y comparten la función de transporte de oxígeno.

RECUADRO 4–5 MÉTODOS Métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína *(continuación de la página anterior)*

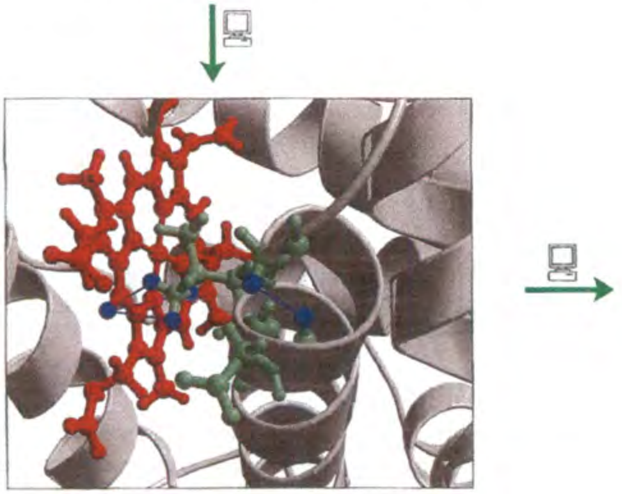
laborioso. Las señales de NOE aportan cierta información sobre las distancias entre átomos individuales, pero para que estas restricciones en las distancias puedan ser útiles, se han de identificar los átomos que originan estas señales. Los experimentos complementarios de TOCSY pueden ayudar a identificar qué señales NOE corresponden a átomos que están unidos por enlaces covalentes. Ciertos patrones de señales NOE se han asociado con estructuras secundarias tales como la hélice α. Con la moderna ingeniería genética (Capítulo 9) se pueden producir proteínas que contengan los isótopos raros ^{13}C o ^{15}N. Las nuevas señales de RMN producidas por estos átomos y el acoplamiento con las señales de ^{1}H producidas por estas sustituciones son de ayuda en la asignación de las señales individuales de ^{1}H NOE. Este proceso también está favorecido por el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Para generar una estructura tridimensional, se introducen las restricciones de distancia en un ordenador junto con restricciones geométricas conocidas, como por ejemplo la quiralidad, los radios de van der Waals y las distancias y ángulos de unión. El ordenador genera una familia de estructuras estrechamente relacionadas que representan una gama de conformaciones consistente con las restricciones de distancia de los NOE (Fig. 3c). La incertidumbre en las estructuras generadas por RMN es en parte un reflejo de las vibraciones moleculares (la "respiración") de la estructura de la proteína en disolución, que se discutirá con más detalle en el Capítulo 5. La incertidumbre experimental normal también juega su papel.

Las estructuras proteicas determinadas tanto por cristalografía de rayos X como por RMN presentan por lo general una buena correlación. En algunos casos, las localizaciones precisas de determinadas cadenas laterales de aminoácidos en el exterior de la proteína son diferentes, a menudo a causa de efectos relacionados con el empaquetamiento de moléculas de proteína adyacentes en el cristal. Las dos técnicas juntas son las responsables de un rápido incremento en la disponibilidad de información estructural sobre las macromoléculas de las células vivas.



(a)



(b)

(c)

FIGURA 3 Uso de la RMN bidimensional para generar una estructura tridimensional de una globina, la misma proteína que se utilizó para generar los datos de la Figura 2. En el espectro bidimensional de RMN la diagonal es equivalente a un espectro monodimensional. Los picos fuera de la diagonal son señales NOE generadas por interacciones de corto alcance de átomos ^{1}H, que pueden generar señales muy distantes en un espectro monodimensional. En **(a)** se identifican dos de estas interacciones y sus identidades se muestran en **(b)** con líneas azules (PDB ID 1VRF). Se han dibujado tres líneas para describir la interacción 2 entre un grupo metilo en la proteína y un hidrógeno en el hemo. El grupo metilo gira rápidamente de forma que cada uno de sus tres hidrógenos contribuye de forma equivalente a la interacción y a la señal de RMN. Este tipo de información se utiliza para determinar la estructura tridimensional completa (PDB ID 1VRE), que se muestra en **(c)**. Las múltiples líneas con que se presenta el esqueleto de la proteína en **(c)** representan una familia de estructuras consistentes con las restricciones de distancia en los datos de RMN. Es evidente la similitud estructural con la mioglobina (Fig. 1). En ambas figuras las proteínas están orientadas en la misma dirección.

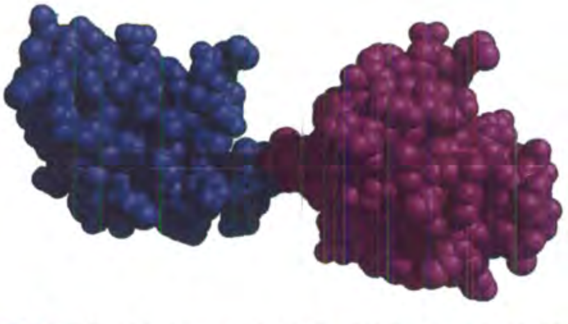


FIGURA 4–18 Dominios estructurales en el polipéptido troponina C. (PDB ID 4TNC) Esta proteína de fijación de calcio asociada con el músculo presenta dos dominios de fijación de calcio separados, indicados en azul y púrpura.

Jane Richardson en 1981, una parte de una cadena polipeptídica que es estable de manera independiente y que puede moverse como una entidad única con respecto al resto de la proteína. Los polipéptidos con más de unos pocos centenares de aminoácidos suelen plegarse formando dos o más dominios, a veces con funciones diferentes. En muchos casos un dominio de una proteína grande mantendrá su estructura tridimensional correcta incluso cuando se separa (por rotura proteolítica, por ejemplo) del resto de la cadena polipeptídica. En una proteína con múltiples dominios, cada uno de ellos puede aparecer como un lóbulo globular distinto **(Fig. 4–18)**; sin embargo, es más habitual que los numerosos contactos entre dominios hagan difícil discernir los dominios individuales. A menudo los diferentes dominios tienen funciones distintas, tales como la unión a pequeñas moléculas o la interacción con otras proteínas. Normalmente las proteínas pequeñas tienen un solo dominio (el dominio *es* la proteína).

El plegamiento de los polipéptidos está sujeto a una serie de restricciones físicas y químicas. Del estudio de los patrones más comunes de plegamiento se ha podido deducir algunas reglas.

1. Las interacciones hidrofóbicas aportan una gran contribución a la estabilidad de las estructuras de las proteínas. La interiorización de los grupos R de los aminoácidos hidrofóbicos que permite la exclusión de las moléculas de agua requiere un mínimo de dos capas de estructura secundaria. Motivos sencillos, tales como el lazo β-α-β (Fig. 4–17a) crean estas dos capas.
2. Cuando coinciden simultáneamente en las proteínas, las hélices α y las hojas β se suelen localizar en diferentes capas estructurales. Esto es debido a que el esqueleto de un segmento polipeptídico en conformación β no puede formar fácilmente enlaces de hidrógeno con una hélice α con la que esté alineado (Fig. 4–6).
3. Los segmentos adyacentes en la secuencia de aminoácidos están normalmente apilados uno junto al otro en la estructura plegada. Aunque segmentos distantes en el polipéptido pueden estar juntos en la estructura terciaria, ésta no es la norma habitual.
4. Las conexiones entre elementos de estructura secundaria no pueden cruzarse o formar nudos **(Fig. 4–19b)**.
5. La conformación β es más estable cuando los segmentos individuales están ligeramente torsionados en sentido dextrógiro. Esto influye tanto en la disposición relativa de las hojas β como en el camino que siguen las conexiones entre ellas. Por ejemplo, dos hebras β paralelas deben conectarse mediante una hebra que cruce por encima (Fig. 4–19b). En principio, este cruzamiento por encima puede tener una conformación levógira o dextrógira, pero en las proteínas casi siempre es dextrógira. Las conexiones dextrógiras tienden a ser más cortas que las conexiones levógiras y tienden a emplear ángulos de giro menores, que son más fáciles de formar. La torsión de las hojas β también conduce a una torsión característica de la estructura formada cuando están juntos muchos segmentos, como en el caso del barril β (Fig. 4–17b) y la hoja β torsionada (Fig. 4–19c), que constituyen el núcleo de muchas estructuras mayores.

Siguiendo estas reglas es posible construir motivos complejos a partir de otros más sencillos. Así, una serie de lazos β-α-β, dispuestos de forma que las hebras β formen un barril, originan un motivo común muy estable denominado **barril α/β**

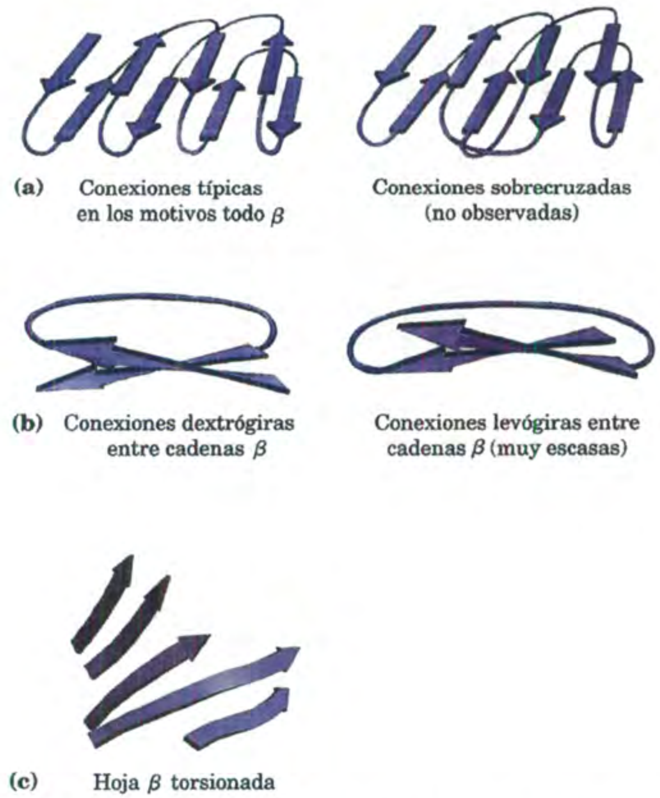


FIGURA 4–19 Patrones de plegamiento estables en proteínas. (a) Conexiones entre cadenas β en hojas β superpuestas. Se muestran las hojas desde un extremo, sin torsiones. Las líneas más gruesas representan conexiones en los extremos más cercanos al observador; las líneas finas están en los extremos más lejanos de las cadenas β. Los conectores de un extremo determinado (por ejemplo, cerca del observador) no se cruzan entre sí. **(b)** Debido a la torsión dextrógira de las cadenas β, las conexiones entre cadenas son generalmente dextrógiras. Las conexiones levógiras deben formar ángulos más agudos y son más difíciles de formar. **(c)** Esta hoja β torsionada forma parte de un dominio de la fotoliasa (una proteína que repara ciertos tipos de lesiones en el DNA) de *E. coli* (PDB ID 1DNP). Se han eliminado los lazos de conexión para concentrar la atención en el plegamiento de la hoja β.

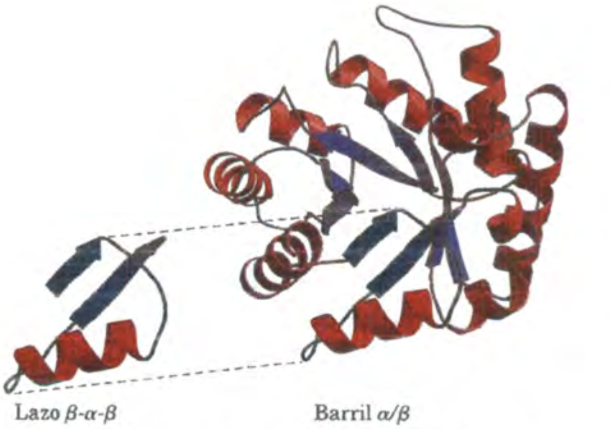


FIGURA 4–20 Construcción de motivos grandes a partir de otros más pequeños. El barril α/β es un motivo muy común construido a partir de repeticiones del motivo de lazo β-α-β . Este barril α/β es un dominio del enzima piruvato quinasa (un enzima glucolítico) de conejo (PDB ID 1PKN).

(Fig. 4–20). En esta estructura cada segmento β paralelo está unido a su vecino por un segmento de hélice α. Todas las conexiones son dextrógiras. El barril α/β se encuentra en muchos enzimas, a menudo con un sitio de unión para un cofactor o sustrato en forma de bolsa cerca de uno de los extremos del barril. Observe que de los dominios que presentan patrones de plegamiento similares se dice que tienen el mismo motivo incluso si sus hélices α y hojas β constituyentes difieren en longitud.

Los motivos proteicos constituyen la base de la clasificación estructural de las proteínas

Arquitectura de proteínas—Estructura terciaria de proteínas globulares, IV. Clasificación estructural de las proteínas Como hemos visto, la percepción de la complejidad de la estructura terciaria disminuye al considerar las subestructuras. Teniendo en cuenta esta idea, los investigadores han organizado el contenido de los bancos de datos de proteínas en base a niveles jerárquicos de la estructura. Todas estas bases de datos se fundamentan en datos e información depositados en el Protein Data Bank. El banco de datos de la Structural Classification of Proteins (SCOP) es un buen ejemplo de esta importante tendencia bioquímica. En el nivel de clasificación más elevado, el banco de datos SCOP (http://scop.mrc-lmb.cam.ac–uk/scop), se apropia de un esquema ya **utilizado comúnmente**, en el que las estructuras de las proteínas se dividen en cuatro clases: **todo α, todo β, α/β** (con los segmentos α y β alternados o entremezclados) y **$\alpha + \beta$** (con las regiones α y β en cierto grado segregadas). Cada clase incluye desde decenas a centenares de disposiciones de plegamiento diferentes (motivos), construidas a partir de subestructuras cada vez más fácilmente identificables. Algunas de las subestructuras son muy comunes, otras se han encontrado sólo en una proteína. La **Figura 4–21** muestra una variedad de motivos ordenados de cada una de las cuatro clases de estructuras de proteínas. Los que se ilustran son sólo una pequeña muestra de los cientos de motivos conocidos. Sin embargo, el número de patrones de plegamiento no es infinito. A medida que la velocidad con que se describen nuevas estructuras proteicas aumenta, disminuye la fracción de estas estructuras que contienen un motivo nuevo. Es posible que existan menos de 1.000 plegamientos o motivos diferentes entre todas las proteínas. La Figura 4–21 también muestra cómo pueden organizarse las proteínas basándose en la presencia de motivos. Los dos niveles superiores de organización, **clase** y **plegamiento,** son puramente estructurales. Por debajo del nivel de plegamiento (véase el código de color en la Fig. 4–21), la categorización se basa en relaciones evolutivas.

Existen muchos ejemplos de dominios o de motivos estructurales repetidamente observados que revelan que la estructura terciaria de proteínas se conserva mucho más que la secuencia primaria. La comparación de estructuras de proteínas puede

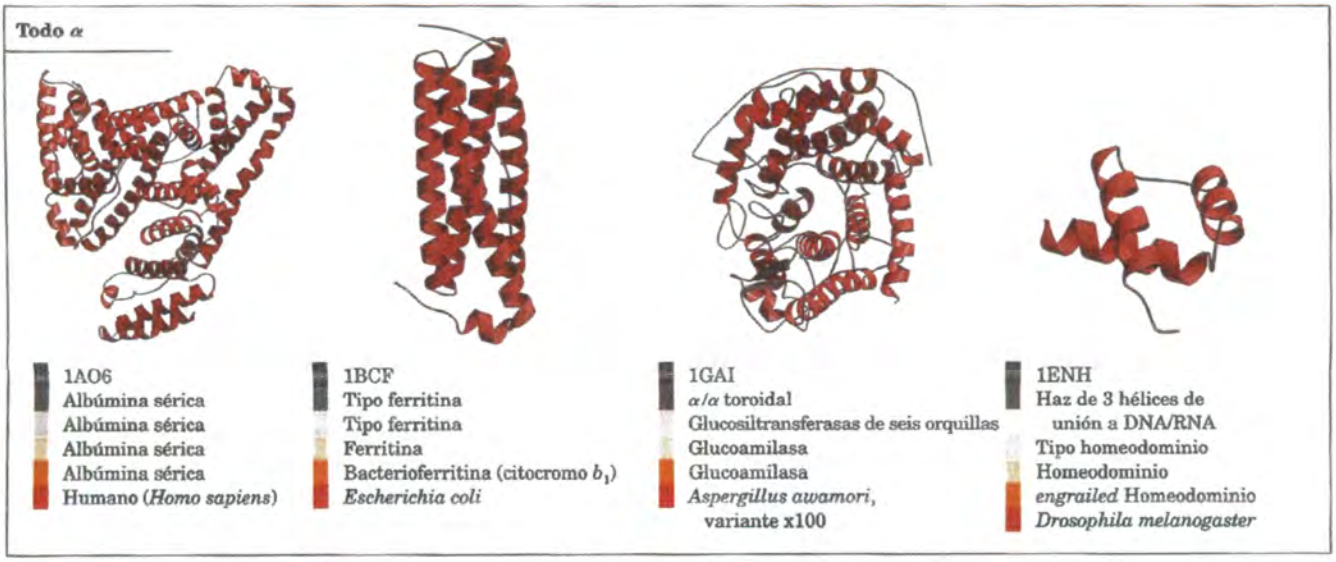
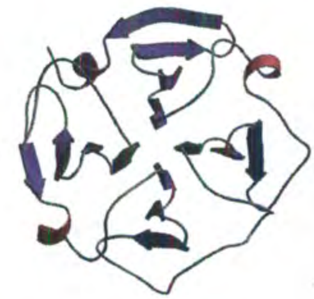


FIGURA 4–21 Organización de las proteínas basada en motivos. Aquí se muestra una pequeña parte de los cientos de motivos estables conocidos. Se dividen en cuatro clases: todo α, todo β, α/β y $\alpha + \beta$. También se proporcionan los datos de clasificación estructural a partir del banco de datos SCOP (Structural Classification of Proteins) (http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop) (véase la clave de color). El identificador de PDB (que aparece en cada estructura) es un número de acceso único que se le da a cada estructura archivada en el Protein Data Bank (www.rcsb.org). El barril α/β, que se muestra en la Figura 4–20, es otro motivo α/β especialmente frecuente.

(La figura continúa en la página siguiente.)

Todo β

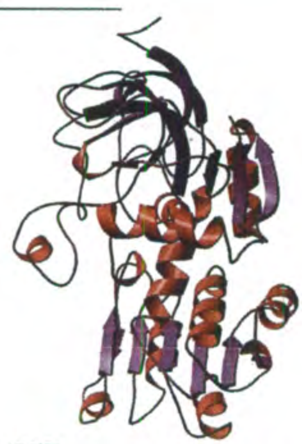
1LXA
Hélice β monohebra levógira
Enzimas tipo LpxA triméricos
UDP *N*-acetilglucosamina aciltransferasa
UDP *N*-acetilglucosamina aciltransferasa
Escherichia coli



1PEX
Propulsor β de cuatro palas
Dominio tipo hemopexina
Dominio tipo hemopexina
Dominio carboxilo terminal de colagenasa-3 (MMP-13)
Humano (*Homo sapiens*)

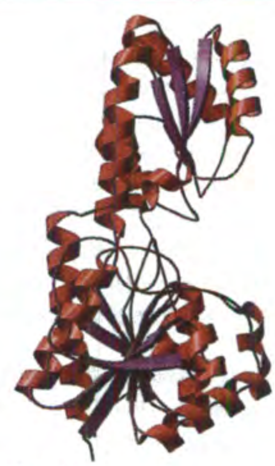
1CD8
β-Sándwich tipo inmunoglobulina
Inmunoglobulina
DominioV (tipo de dominio variable de anticuerpo)
CD8
Humano (*Homo sapiens*)

α/β



1DEH
Dominios de unión a NAD(P) con pleg. de Rossmann
Dominios de unión a NAD(P) con pleg. de Rossmann
Dominio carboxi-terminal de las alcohol/glucosa deshidrogenasas
Alcohol deshidrogenasa
Humano (*Homo sapiens*)

1DUB
ClpP/crotonasa
ClpP/crotonasa
Tipo crotonasa
Enoil-CoA hidratasa (crotonasa)
Rata (*Rattus norvegicus*)



1PFK
Fosfofructoquinasa
Fosfofructoquinasa
Fosfofructoquinasa
Fosfofructoquinasa dependiente de ATP
Escherichia coli

$\alpha + \beta$

2PIL
Pilina
Pilina
Pilina
Pilina
Neisseria gonorrhoeae

1SYN
Timidilato sintasa/dCMP hidroximetilasa
Timidilato sintasa/dCMP hidroximetilasa
Timidilato sintasa/dCMP hidroximetilasa
Timidilato sintasa
Escherichia coli

1EMA
Tipo GFP
Tipo GFP
Proteínas fluorescentes
Proteína verde fluorescente, GFP
Medusa (*Aequorea victoria*)

Identificador PDB
Plegamiento
Superfamilia
Familia
Proteína
Especie

proporcionar, por tanto, mucha información acerca de la evolución. Se dice que pertenecen a la misma **familia de proteínas** aquellas que presentan una similitud significativa en su estructura primaria y que poseen una estructura terciaria y función similares, o que reúnen ambas características. Dentro de una misma familia de proteínas suele resultar evidente la existencia de una relación evolutiva intensa. Por ejemplo, la familia de las globinas está formada por muchas proteínas diferentes con similitudes tanto estructurales como secuenciales con la mioglobina (como se puede ver en las proteínas utilizadas como ejemplo en el Recuadro 4–5 y en el Capítulo 5). Dos o más familias con escasa similitud en la secuencia de aminoácidos utilizan algunas veces el mismo motivo estructural principal y tienen funciones similares; estas familias se agrupan como **superfamilias.** La relación evolutiva entre las familias de una superfamilia se considera probable, a pesar de que el tiempo y las diferencias funcionales, debidas a presiones de adaptación diferentes, puedan haber borrado muchas relaciones secuenciales reveladoras. Una familia de proteínas puede encontrarse repartida en los tres dominios de vida celular: Bacteria, Archaea y Eukarya, lo que sugeriría un origen muy antiguo. Otras familias pueden estar presentes en tan sólo un número pequeño de organismos, lo que indicaría que su estructura apareció más recientemente. La reconstrucción de la historia natural de los motivos estructurales basada en las clasificaciones de bases de datos estructurales tales como SCOP aporta un poderoso complemento a los análisis de secuencias y permite definir muchas relaciones evolutivas. La base de datos SCOP es mantenida manualmente con el objeto de ubicar las proteínas en el marco evolutivo correcto en base a características estructurales conservadas.

En la definición de las familias y superfamilias de proteínas, los motivos estructurales son muy importantes. La mejora en los sistemas de clasificación y comparación de proteínas lleva inevitablemente a la elucidación de nuevas relaciones funcionales. Dado el papel central de las proteínas en los sistemas vivos, estas comparaciones estructurales pueden ayudar a esclarecer todos los aspectos bioquímicos, desde la evolución de las proteínas individuales hasta la historia evolutiva de rutas metabólicas enteras.

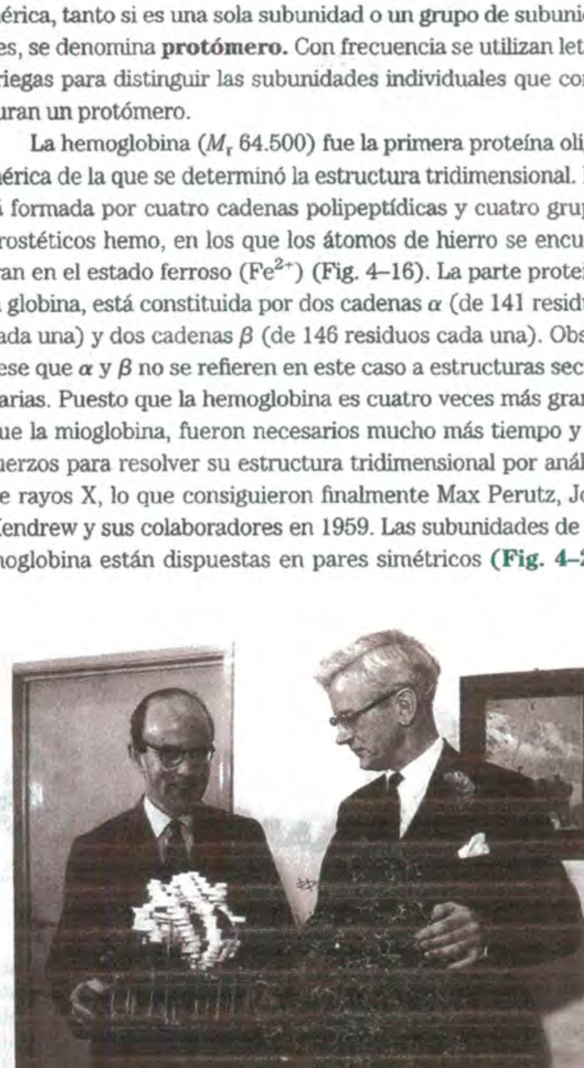
Otras bases de datos y recursos en línea complementan la base de datos SCOP para el análisis de la estructura de proteínas. La base de datos CATH (Clase, Arquitectura, Topología y superfamilia Homóloga) distribuye las proteínas del PDB en una jerarquía de cuatro niveles. Otros programas permiten que el usuario introduzca la estructura de una proteína de interés y pueda encontrar todas las proteínas del PDB que son estructuralmente similares, total o parcialmente. Entre estos programas se incluye VAST (Vector Alignment Search Tool), CE (Combinatorial Extension of the Optimal Paths) y FSSP (Fold Classification Based on Structure-Structure Alignment of Proteins).

Las estructuras cuaternarias de las proteínas comprenden desde dímeros sencillos hasta grandes complejos

Arquitectura de proteínas—Estructura cuartenaria Muchas proteínas presentan múltiples subunidades polipeptídicas (desde dos a centenares de ellas). La asociación de cadenas polipeptídicas puede servir para una diversidad de funciones. Muchas proteínas multisubunidades tienen funciones reguladoras; la unión de pequeñas moléculas puede alterar la interacción entre subunidades produciendo grandes cambios en la actividad de la proteína en respuesta a pequeños cambios en la concentración de sustrato o moléculas reguladoras (Capítulo 6). En otros casos, subunidades diferentes pueden llevar a cabo funciones separadas aunque relacionadas, tales como la catálisis y la regulación. Algunas asociaciones, como por ejemplo las proteínas fibrosas descritas al inicio de este capítulo y las proteínas de la cubierta de los virus, tienen principalmente una función estructural. Algunas estructuras grandes son el sitio donde tienen lugar reacciones complejas con diversos pasos. Por ejemplo, cada uno de los ribosomas, lugar donde se produce la síntesis de proteínas, incorpora docenas de subunidades de proteínas junto con varias moléculas de RNA.

Una proteína multisubunidad se conoce también como **multímero.** Un multímero con sólo unas pocas subunidades se denomina a menudo **oligómero.** Si un multímero está constituido por varias subunidades diferentes, la estructura global de la proteína puede ser asimétrica y bastante complicada. Sin embargo, la mayoría de los multímeros tienen subunidades idénticas o grupos repetidos de subunidades no idénticas a menudo dispuestos simétricamente. Como se dijo en el Capítulo 3, la unidad de repetición estructural en este tipo de proteína multimérica, tanto si es una sola subunidad o un grupo de subunidades, se denomina **protómero.** Con frecuencia se utilizan letras griegas para distinguir las subunidades individuales que configuran un protómero.

La hemoglobina (M_r 64.500) fue la primera proteína oligomérica de la que se determinó la estructura tridimensional. Está formada por cuatro cadenas polipeptídicas y cuatro grupos prostéticos hemo, en los que los átomos de hierro se encuentran en el estado ferroso (Fe^{2+}) (Fig. 4–16). La parte proteica, la globina, está constituida por dos cadenas α (de 141 residuos cada una) y dos cadenas β (de 146 residuos cada una). Obsérvese que α y β no se refieren en este caso a estructuras secundarias. Puesto que la hemoglobina es cuatro veces más grande que la mioglobina, fueron necesarios mucho más tiempo y esfuerzos para resolver su estructura tridimensional por análisis de rayos X, lo que consiguieron finalmente Max Perutz, John Kendrew y sus colaboradores en 1959. Las subunidades de hemoglobina están dispuestas en pares simétricos **(Fig. 4–22)**



Max Perutz, 1914–2002 (izq.) John Kendrew, 1917–1997 (der.)

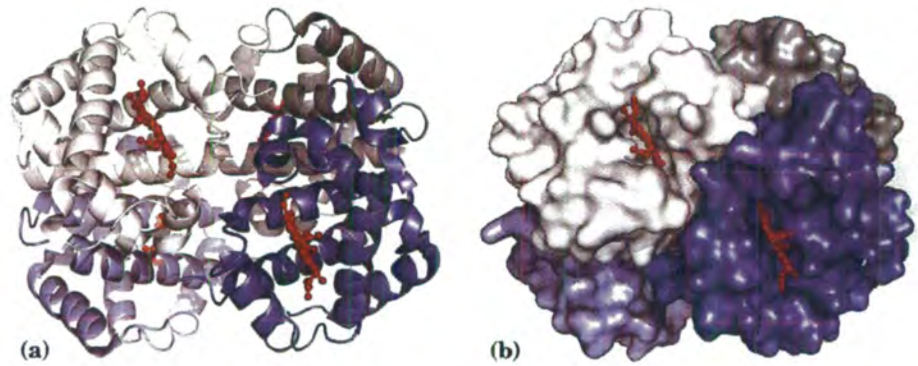


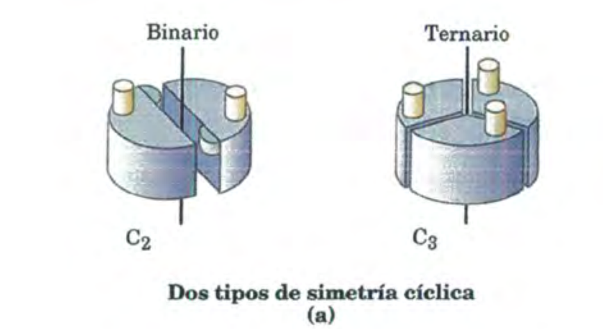
FIGURA 4–22 Estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina. (PDB ID 2HHB) El análisis de difracción de rayos X de la desoxihemoglobina (hemoglobina sin moléculas de oxígeno unidas a los grupos hemo) muestra como se empaquetan juntas las cuatro subunidades polipeptídicas. **(a)** Representación de cintas. **(b)** Modelo de contorno de superficie. Las subunidades α se muestran en tonos de gris; las subunidades β en tonos de azul. Obsérvese que los grupos hemo (rojo) están relativamente alejados.

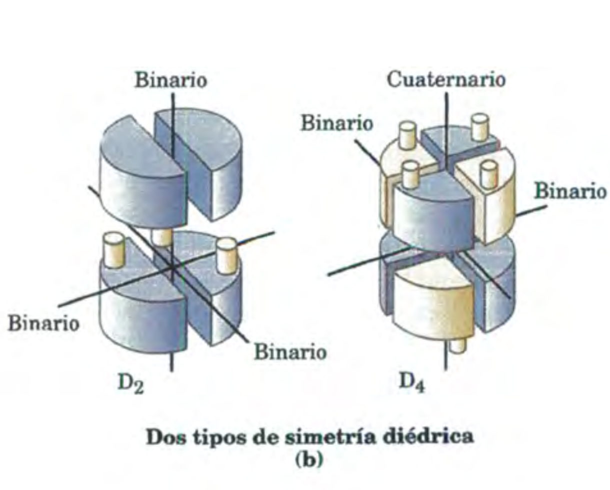
con una subunidad α y una subunidad β cada uno. Por tanto, la hemoglobina se puede describir como un tetrámero o como un dímero de protómeros $\alpha\beta$.

Las subunidades idénticas de las proteínas multiméricas se ordenan generalmente en uno o en un número limitado de patrones de simetría. Para la descripción de la estructura de estas proteínas se necesita un conocimiento de las convenciones utilizadas para definir las simetrías. Los oligómeros pueden tener **simetría rotatoria** o **simetría helicoidal;** esto es, se pueden superponer (haciéndolas coincidir) unas subunidades individuales a las otras mediante la rotación alrededor de uno o más ejes de rotación o mediante una rotación helicoidal. En proteínas con simetría rotatoria, las subunidades se empaquetan alrededor de los ejes de rotación formando estructuras cerradas. Las proteínas con simetría helicoidal tienden a formar estructuras que están más abiertas por los extremos, con las subunidades añadidas según una ordenación en espiral.

Existen diferentes tipos de simetría rotatoria. La más sencilla es la **simetría cíclica,** que implica la rotación alrededor de un eje único. **(Fig. 4–23a).** Por convención, una proteína tiene simetría C_n (C de cíclico y n por el número de subunidades relacionadas por el eje) si las subunidades se pueden superponer mediante rotación alrededor de un único eje. El eje se define como un eje rotatorio de orden n. Los protómeros $\alpha\beta$ de la hemoglobina están relacionados por un eje de simetría C_2 (Fig. 4–22). Una simetría rotatoria un poco más complicada es la **simetría diédrica,** en la que un eje de rotación binario intersecciona en ángulo recto con un eje de orden n; esta simetría se define como D_n (Fig. 4–23b). Una proteína con simetría diédrica tiene $2n$ protómeros.

Las proteínas con simetría cíclica o diédrica son muy abundantes. Son posibles simetrías rotatorias más complejas, pero sólo unas pocas se encuentran con regularidad. Un ejemplo es la **simetría icosaédrica.** Un icosaedro es un poliedro regular con





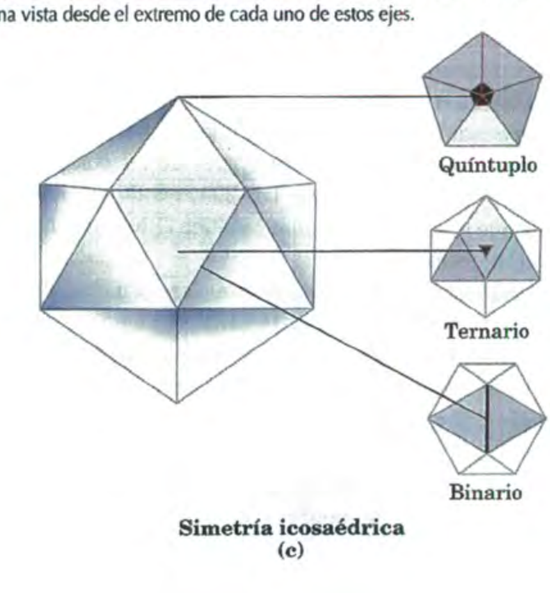


FIGURA 4–23 Simetría rotatoria en proteínas. (a) En la simetría cíclica, las subunidades están relacionadas por rotación alrededor de un único eje de orden n, donde n es el número de subunidades relacionadas de este modo. Los ejes se muestran como líneas negras; los números son valores de n. De las múltiples disposiciones posibles tipo C_n sólo se muestran dos. **(b)** En la simetría diédrica, todas las subunidades se pueden relacionar mediante la rotación alrededor de uno, o ambos, de los dos ejes, uno de los cuales es un eje binario. La simetría D_2 es la más común. **(c)** Simetría icosaédrica. Para relacionar las 20 caras triangulares de un icosaedro se necesita rotar alrededor de uno o más ejes rotatorios separados: binario, ternario y quíntuplo. En la figura de la derecha se muestra una vista desde el extremo de cada uno de estos ejes.

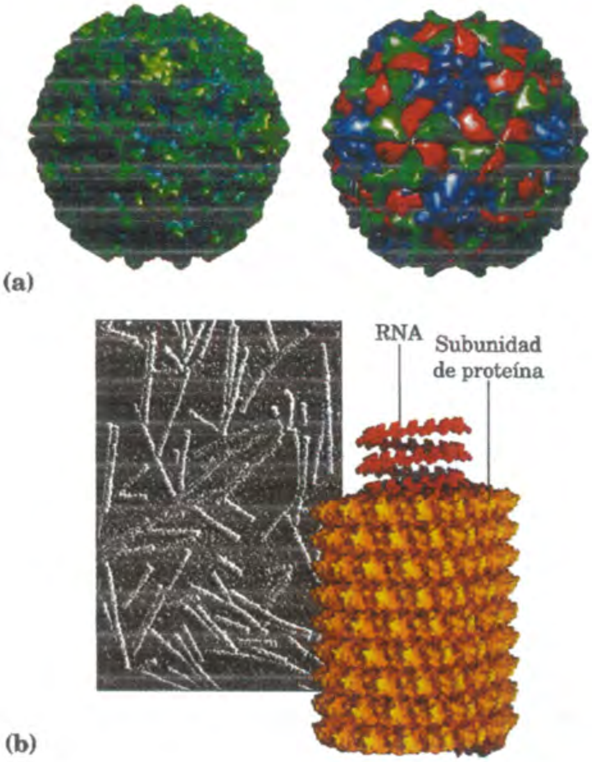


FIGURA 4–24 Cápsidas de virus. (a) Virus de la polio (PDB ID 2PLV) a partir de la base de datos relacional de biología estructural VIPER. Las proteínas de la cubierta del virus de la polio se ensamblan formando un icosaedro de 300 Å de diámetro. La simetría icosaédrica es un tipo de simetría de rotación (véase la Fig. 4–23c). A la izquierda se presenta una imagen de un contorno de superficie de la cápsida del virus de la polio. La imagen de la derecha está hecha a menor resolución y en ella se han coloreado las proteínas de la cápsida para mostrar la simetría icosaédrica. **(b)** Virus del mosaico del tabaco (PDB ID 1VTM). Este virus en forma de varilla (tal como se muestra en la micrografía electrónica) tiene 3.000 Å de longitud y 180 Å de diámetro; presenta simetría helicoidal.

12 vértices y 20 caras triangulares equilaterales (Fig. 4–23c). Puede hacerse coincidir cada cara con otra mediante la rotación alrededor de uno o más de sus tres ejes rotacionales. Esta estructura es común en las cubiertas de los virus o cápsidas. Los poliovirus humanos tienen una cápsida icosaédrica (Fig. 4–24a). Cada cara triangular está constituida por tres protómeros, y a su vez cada protómero contiene una única copia de cuatro cadenas polipeptídicas diferentes, tres de las cuales son accesibles a la superficie externa. Las 20 caras de la cubierta icosaédrica que encierra el material genético (RNA) están formada por 60 protómeros.

La simetría helicoidal, que es la otra clase principal de simetría encontrada en oligómeros, también se da en las cápsidas. El virus del mosaico del tabaco está formado por un filamento helicoidal dextrógiro constituido por 2.130 subunidades idénticas (Fig 4–24b). Esta estructura cilíndrica encierra el RNA vírico. Las proteínas con subunidades dispuestas en filamentos helicoidales también pueden formar largas estructuras fibrosas tales como los filamentos de actina del músculo (véase la Fig. 5–28).

RESUMEN 4.3 Estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas

- La estructura terciaria es la estructura tridimensional completa de una cadena polipeptídica. Existen dos clases generales de proteínas en base a la estructura terciaria: fibrosas y globulares.
- Las proteínas fibrosas, que desempeñan muchos papeles estructurales, están formadas por elementos repetitivos simples de estructura secundaria.
- Las proteínas globulares tienen estructuras terciarias más complicadas que a menudo contienen varios tipos de estructura secundaria en la misma cadena polipeptídica. La primera proteína globular cuya estructura se determinó mediante métodos de difracción de rayos X fue la mioglobina.
- Las complejas estructuras de las proteínas globulares pueden analizarse examinando patrones de plegamiento denominados estructuras supersecundarias, motivos o plegamientos. Los miles de estructuras proteicas conocidas suelen estar construidas a partir de unos pocos centenares de motivos. Los dominios son regiones de la cadena polipeptídica que son capaces de plegarse de forma estable e independiente.
- La estructura cuaternaria se forma como consecuencia de interacciones entre las subunidades de proteínas multisubunidades (multiméricas) o de grandes complejos proteicos. Algunas proteínas multiméricas posen una unidad repetitiva consistente en una única subunidad o en un grupo de subunidades que se denomina protómero. Los protómeros suelen estar relacionados mediante simetría rotativa o helicoidal.

4.4 Desnaturalización y plegamiento de proteínas

Todas las proteínas empiezan su existencia en un ribosoma como una secuencia lineal de residuos de aminoácidos (Capítulo 27). Para alcanzar su conformación nativa, este polipéptido debe plegarse durante y después de la síntesis. Hemos visto que la conformación de una proteína nativa es sólo marginalmente estable. Cambios modestos en el entorno de la proteína pueden acarrear cambios estructurales capaces de afectar a la función. A continuación vamos a explorar la transición entre los estados plegado y desplegado.

La pérdida de la estructura conduce a la pérdida de función

Las estructuras proteicas han evolucionado para funcionar en entornos celulares concretos. Condiciones diferentes a las de la célula pueden provocar cambios, grandes y pequeños, en la estructura de la proteína. La pérdida de estructura tridimensional suficiente para originar la pérdida de la función se denomina **desnaturalización.** El estado desnaturalizado no se equipara necesariamente con el desplegamiento completo de la proteína y la pérdida total de la conformación. En la mayoría de condiciones, las proteínas desnaturalizadas existen como un conjunto de estados parcialmente plegados de los que se sabe muy poco.

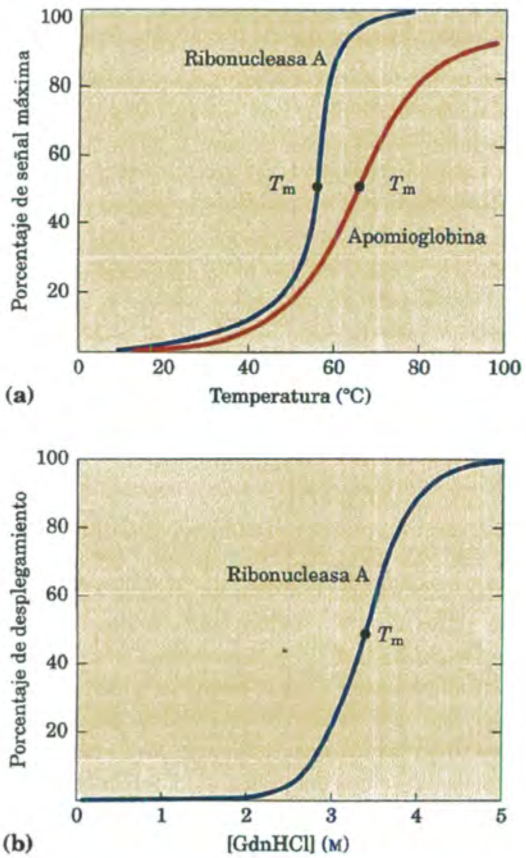


FIGURA 4–25 Desnaturalización de proteínas. Se muestran los resultados para proteínas desnaturalizadas mediante dos tipos de cambios del entorno. En cada caso, la transición del estado plegado al desplegado es muy abrupta, lo que sugiere cooperatividad en el proceso de desplegamiento. **(a)** Desnaturalización térmica de la apomioglobina de caballo (mioglobina sin el grupo prostético hemo) y ribonucleasa A (con los enlaces disulfuro intactos; véase la Fig. 4–26). El punto medio en el intervalo de temperaturas en el que tiene lugar la desnaturalización se denomina temperatura de fusión o T_m. La desnaturalización de la apomioglobina se siguió mediante dicroísmo circular (véase la Fig. 4–9), una técnica que mide la cantidad de estructura helicoidal en una proteína. Se siguió la desnaturalización de la ribonucleasa A midiendo los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína, la cual se ve afectada por los cambios de entorno de los residuos de Trp. **(b)** Desnaturalización de la ribonucleasa A con los enlaces disulfuro intactos mediante cloruro de guanidinio (GdnHCl), seguida mediante dicroísmo circular.

La mayoría de las proteínas se pueden desnaturalizar mediante calor, el cual afecta de una manera compleja a las interacciones débiles de una proteína (los enlaces de hidrógeno principalmente). Si se aumenta lentamente la temperatura, la conformación de la proteína suele permanecer intacta hasta que tiene lugar una pérdida brusca de la estructura (y de la función) dentro de un estrecho margen de temperaturas **(Fig. 4–25)**. La brusquedad del cambio sugiere que el desplegamiento es un proceso cooperativo: la pérdida de estructura en una parte de la proteína desestabiliza otras partes. El efecto del calor sobre las proteínas no es un efecto fácilmente predecible. Las proteínas muy estables al calor de las bacterias termófilas y arqueas han evolucionado para poder funcionar a la temperatura de las fuentes termales (~100 °C). No obstante, la estructura de estas proteínas difiere a menudo muy poco de la de sus proteínas homólogas de bacterias tales como *Escherichia coli*. Aún no se sabe de qué modo estas pequeñas diferencias promueven estabilidad estructural a temperaturas elevadas.

La desnaturalización de proteínas también puede llevarse a cabo por la acción de extremos de pH, de ciertos disolventes orgánicos miscibles en agua como por ejemplo el alcohol o la acetona, de ciertos solutos tales como la urea o el cloruro de guanidinio, o mediante detergentes. El tratamiento con cada uno de estos agentes desnaturalizantes puede considerarse relativamente suave, en el sentido de que no se rompen enlaces covalentes de la cadena polipeptídica. Los disolventes orgánicos, la urea y los detergentes actúan principalmente rompiendo las interacciones hidrofóbicas que forman el núcleo estable de las proteínas globulares; los extremos de pH alteran la carga neta de la proteína, dando lugar a la aparición de repulsiones electrostáticas y a la destrucción de algunos enlaces de hidrógeno. Las estructuras desnaturalizadas obtenidas con estos diversos tratamientos no son necesariamente equivalentes.

La secuencia de aminoácidos determina la estructura terciaria

La estructura terciaria de una proteína globular está determinada por su secuencia de aminoácidos. La prueba más impor-

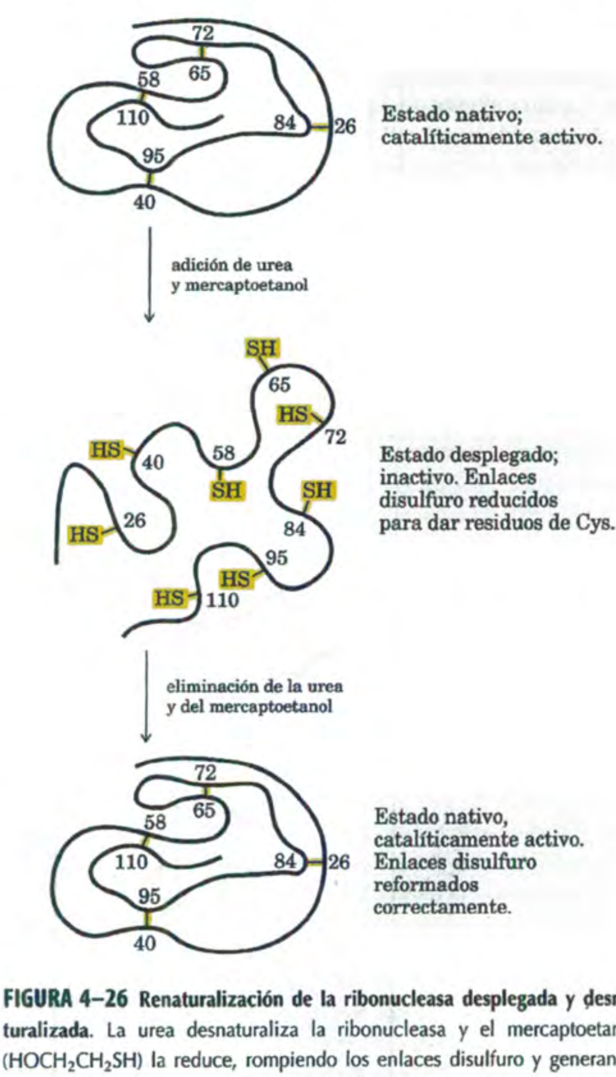


FIGURA 4–26 Renaturalización de la ribonucleasa desplegada y desnaturalizada. La urea desnaturaliza la ribonucleasa y el mercaptoetanol ($HOCH_2CH_2SH$) la reduce, rompiendo los enlaces disulfuro y generando ocho residuos de Cys. La renaturalización implica la restauración de los enlaces disulfuro correctos.

tante vino de experimentos que demostraron que la desnaturalización de algunas proteínas es reversible. Algunas proteínas globulares desnaturalizadas por el calor, extremos de pH o reactivos desnaturalizantes, son capaces de recuperar su estructura nativa y su actividad biológica si son devueltas a condiciones en las que la conformación nativa es estable. Este proceso se conoce como **renaturalización.**

Un ejemplo clásico es la desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa A, demostrada por Christian Anfinsen en la década de 1950. La ribonucleasa A purificada se desnaturaliza completamente mediante exposición a una disolución concentrada de urea en presencia de un agente reductor. El agente reductor rompe los cuatro puentes disulfuro dando lugar a ocho residuos Cys y la urea elimina las interacciones hidrofóbicas estabilizantes, con lo que el polipéptido pierde completamente su conformación plegada. A la desnaturalización de la ribonucleasa le acompaña una pérdida completa de la actividad catalítica. Cuando se eliminan la urea y el agente reductor, la ribonucleasa desplegada y desnaturalizada se vuelve a plegar espontáneamente adoptando su estructura terciaria correcta y recuperando completamente su actividad catalítica **(Fig. 4–26)**. El replegamiento de la ribonucleasa es tan preciso que los cuatro puentes disulfuro intracatenarios se forman en las mismas posiciones originales observadas en la ribonucleasa nativa. Cálculos matemáticos demuestran que las ocho Cys podrían haberse recombinado al azar para formar cuatro puentes disulfuro de 105 maneras diferentes. De hecho, cuando se permite reformar los disulfuros en presencia del desnaturalizante (y sin el agente reductor), se obtiene una distribución de enlaces disulfuro esencialmente al azar, lo que indica que las interacciones por uniones débiles son necesarias para el posicionamiento correcto de los enlaces disulfuro y la adopción de la conformación nativa. Más adelante se obtuvieron resultados similares usando ribonucleasa A sintetizada químicamente y catalíticamente activa. Con esto se eliminaba la posibilidad de que algún contaminante residual de la preparación de ribonucleasa de Anfinsen hubiera podido contribuir a la renaturalización del enzima, disipando cualquier duda sobre la capacidad de plegamiento espontáneo del enzima.

El experimento de Anfinsen demostró por primera vez que la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica contiene toda la información necesaria para el plegamiento de la cadena en su estructura tridimensional nativa. Trabajos posteriores han demostrado que esta afirmación sólo es válida para una minoría de proteínas, muchas de ellas pequeñas e inherentemente estables. A pesar de que todas las proteínas poseen realmente el potencial para plegarse y generar su estructura nativa, muchas requieren, como veremos más adelante, algún tipo de asistencia.

Los polipéptidos se pliegan rápidamente en un proceso de varias etapas

En las células vivas, las proteínas se forman a partir de los aminoácidos a una gran velocidad. Por ejemplo, las células de *E. coli* pueden producir una molécula de proteína entera y biológicamente activa de 100 residuos aminoácidos en aproximadamente 5 segundos a 37 °C . ¿Cómo alcanza esta cadena polipéptidica su conformación nativa? Vamos a suponer, en un cálculo a la baja, que cada residuo de aminoácido puede adoptar una media de 10 conformaciones diferentes, lo que origina 10^{100} conformaciones diferentes del polipéptido. Supongamos también que la proteína se pliega espontáneamente mediante un proceso al azar en el que ensaya todas las conformaciones posibles en torno de cada enlace sencillo de su esqueleto peptídico hasta encontrar su forma nativa biológicamente activa. Si cada conformación se ensayara en el período de tiempo más corto posible ($\sim 10^{-13}$ s, o sea el tiempo requerido para una sola vibración molecular), probar todas las conformaciones posibles requeriría unos 10^{77} años. Por tanto, el plegamiento de proteínas no puede ser un proceso completamente al azar en el que se siga el método de prueba y error. Deben existir atajos para el plegamiento. Este problema fue apuntado por primera vez en 1968 por Cyrus Levinthal y a menudo se denomina la paradoja de Levinthal.

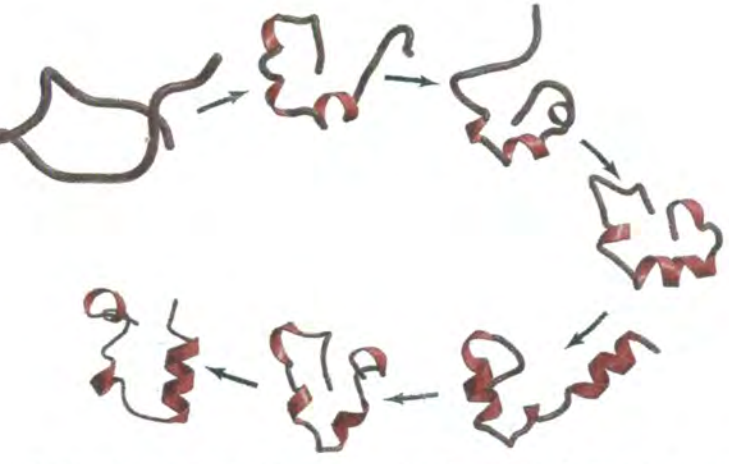


FIGURA 4–27 Simulación de una ruta de plegamiento. Se ha simulado mediante ordenador la ruta de plegamiento de un subdominio de 36 residuos de la proteína villina (una proteína que se une a actina y que se encuentra principalmente en las microvellosidades del intestino). El proceso comienza con el péptido en ovillo estadístico y 3.000 moléculas de agua circundantes en una "caja de agua" virtual. Al hacer un mapa de las rutas más probables para llegar a la estructura final entre las incontables alternativas, se tuvieron en consideración los movimientos moleculares del péptido y los efectos de las moléculas de agua. El plegamiento simulado tuvo lugar en un período de tiempo teórico de 1 ms.

La ruta de plegamiento de una cadena polipéptidica grande es, sin ningún género de dudas, muy complicada y todavía no se conocen con detalle todos los principios que guían el proceso. Sin embargo, existen varios modelos plausibles. En uno de los modelos, se considera que el proceso está jerarquizado. Las estructuras secundarias locales se formarían primero. Ciertas secuencias de aminoácidos se pliegan fácilmente en hélices α u hojas β guiadas por las restricciones que hemos revisado en nuestra discusión sobre la estructura secundaria. Las interacciones iónicas, que involucran grupos cargados situados a menudo unos cerca de otros en la secuencia lineal del polipéptido, pueden jugar un papel importante en la conducción de estos primeros pasos del plegamiento. Después de la formación de las estructuras locales se construyen las interacciones de largo alcance entre, por ejemplo, dos hélices α que se acercan para formar estructuras supersecundarias estables. El proceso continúa hasta la completa formación de dominios y el plegamiento del polipéptido entero **(Fig. 4–27)**. Es destacable el hecho de que las proteínas dominadas por interacciones de corto alcance (entre pares de residuos generalmente cercanos en la cadena polipeptídica) tienden a plegarse más rápido que las que tienen un plegamiento más complejo y muchas interacciones de largo alcance entre los diferentes segmentos.

En un modelo alternativo, el plegamiento se inicia mediante un colapso espontáneo de la cadena polipeptídica que da lugar a un estado compacto mediado por interacciones hidrofóbicas entre residuos no polares. El estado resultante de este "colapso hidrofóbico" puede ser rico en estructura secundaria, aunque muchas de las cadenas laterales de los aminoácidos no están completamente fijadas. El estado colapsado se conoce a menudo como **glóbulo fundido.** Es probable que la mayoría de las proteínas se plieguen mediante un proceso que incorpora características de ambos modelos. En lugar de seguir un camino único, una población de moléculas peptídicas puede tomar diversos caminos hacia el mismo punto final con una disminución del número de diferentes especies conformacionales parcialmente plegadas a medida que el plegamiento se va completando.

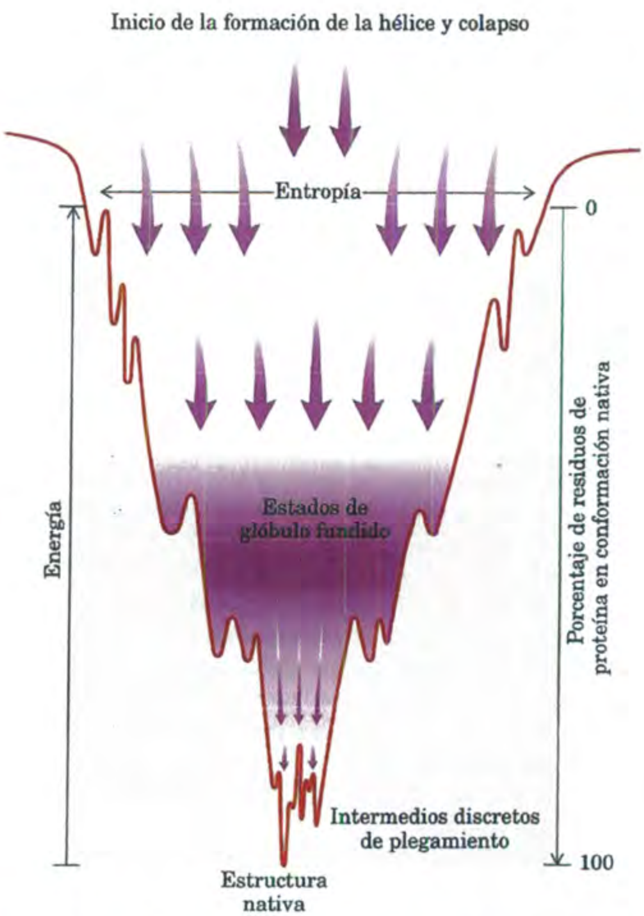


FIGURA 4–28 Termodinámica del plegamiento de una proteína representada como un embudo de energía libre. En la parte superior, el número de conformaciones y, por tanto, la entropía conformacional es grande. Sólo están presentes una pequeña fracción de las interacciones intramoleculares que existirán en la conformación nativa. A medida que el plegamiento avanza, la ruta termodinámica hacia la parte inferior del embudo reduce el número de estados presentes (disminuye la entropía), aumenta la cantidad de proteína en la conformación nativa y disminuye la energía libre. Las depresiones en los laterales del embudo representan intermediarios de plegamiento semiestables los cuales, en algunos casos, pueden enlentecer el proceso de plegamiento.

El proceso de plegamiento se puede imaginar, termodinámicamente, como una especie de embudo de energía libre **(Fig. 4–28)**. Los estados no plegados se caracterizan por un elevado grado de entropía conformacional y una energía libre relativamente elevada. A medida que el plegamiento avanza, el estrechamiento del embudo representa una disminución en el número de especies conformacionales presentes. Las pequeñas depresiones a lo largo de las caras del embudo de energía libre representan intermediarios semiestables que pueden enlentecer momentáneamente el proceso de plegamiento. El conjunto de intermediarios del plegamiento se reduce, en el fondo del embudo, a una única conformación nativa (o una dentro de un pequeño conjunto de conformaciones nativas).

La estabilidad termodinámica no se distribuye uniformemente en la estructura de la proteína; la molécula tiene regiones de alta y de baja estabilidad. Una proteína puede, por ejemplo, tener dos dominios estables unidos por un segmento de menor estabilidad, o una parte pequeña de un dominio puede tener menor estabilidad que el resto. Las regiones de estabilidad baja permiten que la conformación de la proteína fluctúe entre dos o más estados. Como veremos en los dos próximo capítulos, las variaciones en la estabilidad de las regiones dentro de una proteína suelen ser esenciales para la función.

Al ir aumentando nuestros conocimientos sobre el plegamiento y la estructura de las proteínas se van desarrollando programas informáticos cada vez más sofisticados para predecir la estructura a partir de la secuencia de aminoácidos. La predicción de estructura de proteínas es un campo especializado de la bioinformática cuyo progreso se evalúa bianualmente mediante la competición CASP (Critical Assessment of Structural Prediction, Evaluación crítica de predicción estructural). Participantes de todo el mundo compiten para predecir de la manera más exacta la estructura de una proteína determinada (conocida, pero no publicada). Se invita a los equipos que se aproximan más al resultado correcto a presentar sus resultados en la conferencia CASP. Todavía no se dispone de soluciones completamente fiables al problema complejo de la predicción de estructuras proteicas, pero CASP contribuye al aumentar éxito y rigor de los nuevos métodos.

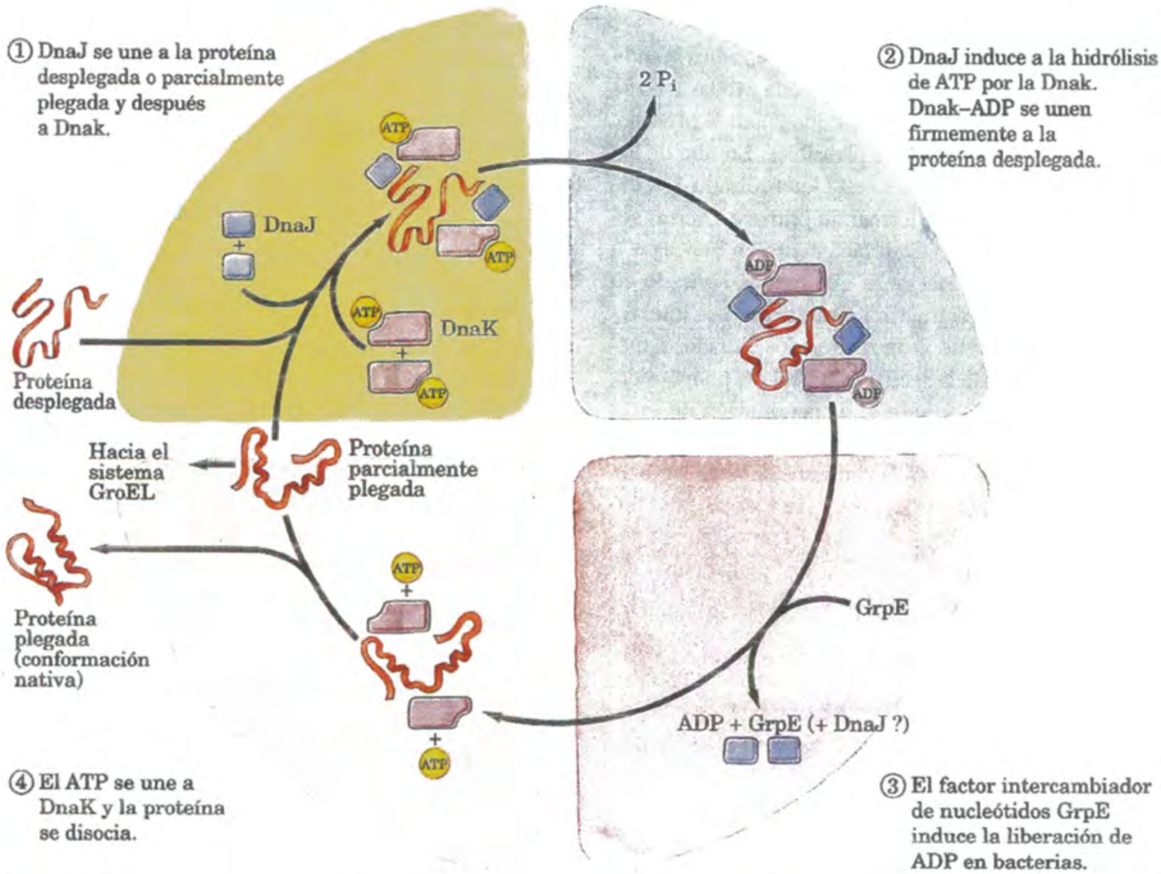


FIGURA 4–29 Las chaperonas en el plegamiento de las proteínas. La ruta cíclica por la cual las chaperonas se unen y se liberan de los polipéptidos se ilustra para las proteínas chaperonas de *E. coli* DnaK y DnaJ, homólogas de las chaperonas eucarióticas Hsp70 y Hsp40. Las chaperonas no promocionan activamente el plegamiento de la proteína sustrato, sino que impiden la agregación de los péptidos no plegados. De una población determinada de moléculas de polipéptidos, una cierta fracción de ellas se libera al final del ciclo en la conformación nativa. El resto se vuelven a unir a DnaK o se desvían hacia el sistema de chaperoninas (GroEL; véase la Fig. 4–30). En bacterias, una proteína denominada GrpE interacciona transitoriamente con DnaK al final del ciclo (paso ③), promocionando la disociación de ADP y, posiblemente, DnaJ. No se conoce un análogo de GrpE en eucariotas.

Algunas proteínas experimentan un plegamiento asistido

No todas las proteínas se pliegan espontáneamente a medida que se sintetizan en la célula. Para el plegamiento de muchas proteínas es necesaria la acción de las **chaperonas moleculares,** proteínas que interaccionan con polipéptidos parcial o incorrectamente plegados, facilitando rutas de plegamiento correctas o aportando microentornos en los que pueda tener lugar el plegamiento. Se conocen bien dos clases de chaperonas moleculares. Ambas se localizan en organismos que van de bacterias a humanos. La primera clase, una familia de proteínas denominada **Hsp70** (véase la Fig. 3–30), presentan generalmente una masa molecular cercana a 70.000 y son más abundantes en células sometidas a estrés por temperaturas elevadas (de aquí proteínas de choque térmico –por *h*eat *s*hock *p*roteins– de M_r 70.000 o Hsp70). Las Hsp70 se unen a regiones ricas en residuos hidrofóbicos de polipéptidos no plegados, evitando la agregación inapropiada. Por tanto, estas chaperonas "protegen" a las proteínas que se han desnaturalizado por calor y a los péptidos que se están sintetizando (y que aún no están plegados). Las proteínas Hsp70 también bloquean el plegamiento de determinadas proteínas que deben permanecer desplegadas hasta que hayan sido traslocadas a través de la membrana (como se describe en el Capítulo 27). Algunas chaperonas también ayudan en el empaquetamiento cuaternario de proteínas oligoméricas. Las proteínas Hsp70 se unen a polipéptidos y los liberan en un ciclo que usa la energía del ATP y en el que también intervienen otras proteínas (incluidas las de una clase llamada Hsp40). En la **Figura 4–29** se muestra el plegamiento asistido por chaperonas tal como se ha elucidado para las chaperonas DnaK y DnaJ de *E. coli*, homólogas de las Hsp70 y Hsp40 de eucariotas. Las proteínas DnaK y DnaJ se identificaron en un principio como proteínas necesarias para la replicación in vitro de ciertas moléculas de DNA vírico (de aquí la designación de "Dna").

La segunda clase de chaperonas se denominan **chaperoninas.** Éstas son elaborados complejos proteicos necesarios para el plegamiento de muchas proteínas celulares que no se pliegan espontáneamente. En condiciones normales, se estima que entre un 10 y un 15% de proteínas celulares de *E. coli* necesitan el sistema propio de chaperonina, denominado GroEL/GroES, para plegarse (cuando las células se someten a estrés por calor hasta un 30% necesitan esta asistencia). Las chaperoninas se descubrieron cuando se observó que eran necesarias para el crecimiento de ciertos virus bacterianos (de aquí la designación "Gro", *gro*wth). Las proteínas desplegadas

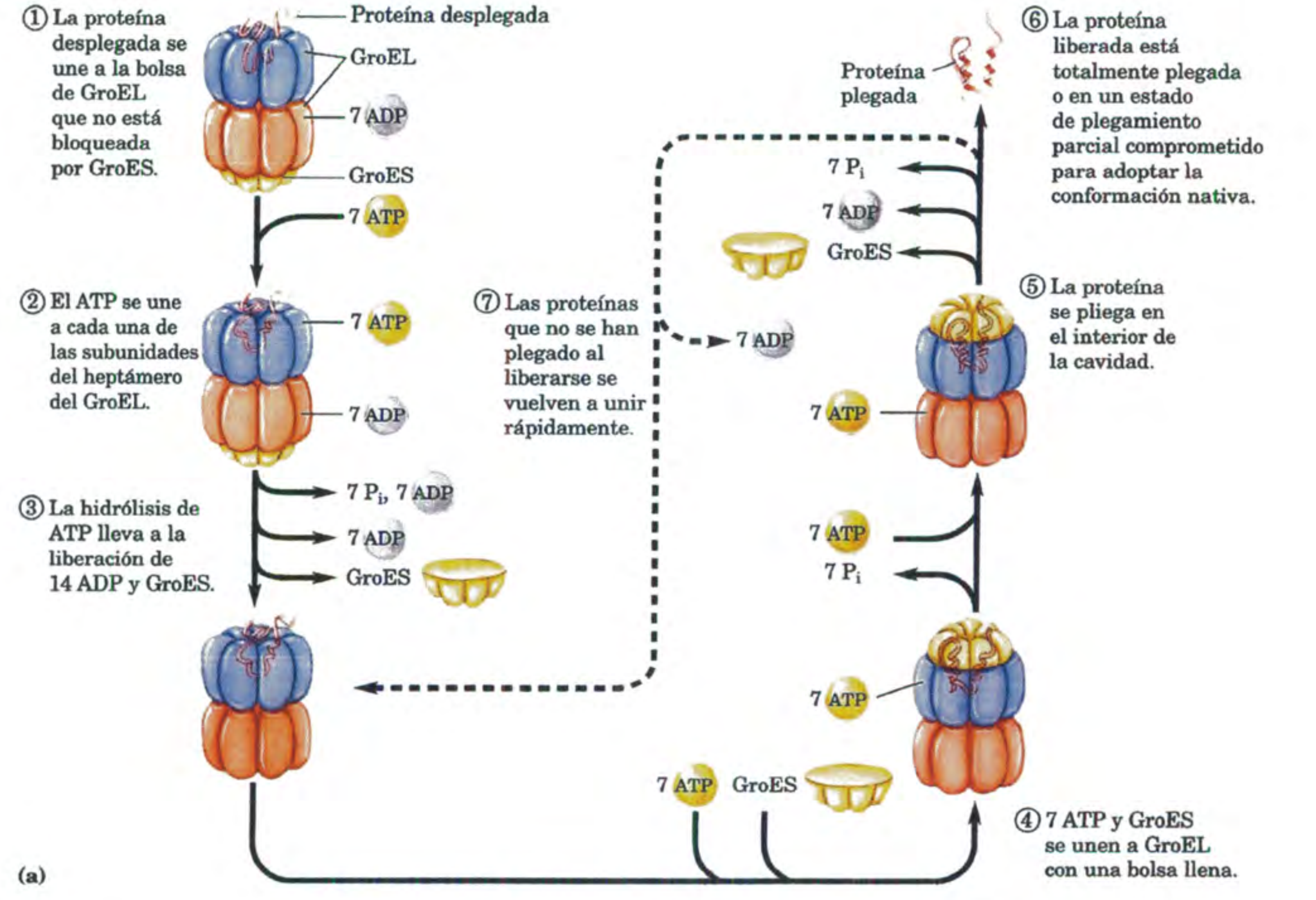
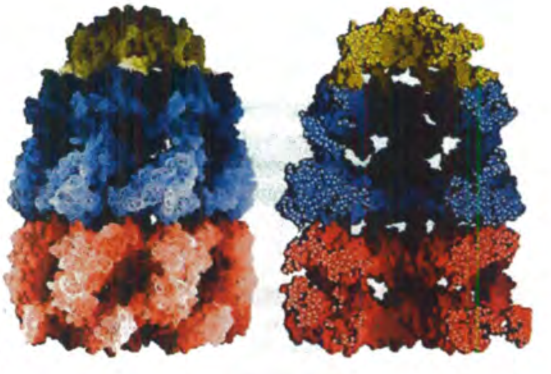


FIGURA 4–30 Las chaperoninas en el plegamiento de proteínas. (a) Una ruta propuesta para la actuación de las chaperoninas de *E. coli*, GroEL (un miembro de la familia de proteínas Hsp60) y GroES. Cada complejo GroEL está formado por dos bolsas grandes formadas por dos anillos heptaméricos (cada subunidad tiene un M_r 57.000). GroES, es también un heptámero (subunidades de M_r 10.000) y bloquea una de las bolsas de GroEL. **(b)** Superficie e imágenes de corte transversal del complejo GroEL/GroES (PDB ID 1AON). El corte transversal (derecha) muestra el gran espacio interior en el que se pueden unir otras proteínas.



se unen en el interior de cavidades del complejo GroEL, el cual se encuentra tapado transitoriamente por la "tapa" de GroES (**Fig. 4–30**). GroEL experimenta cambios conformacionales importantes acoplados a la hidrólisis de ATP y a la unión y liberación de GroES, que promueven el plegamiento del polipéptido unido. No se conoce con detalle el mecanismo por el que la chaperonina GroEL/GroES facilita el plegamiento, pero depende del tamaño y de las propiedades de la superficie interna de la cavidad donde se desarrolla el plegamiento.

Finalmente, la ruta de plegamiento de muchas proteínas necesita dos enzimas que catalizan reacciones de isomerización. La **proteína disulfuro isomerasa (PDI)** es un enzima ampliamente distribuido que cataliza el intercambio o la mezcla de enlaces disulfuro hasta que se forman los enlaces de la conformación nativa. Entre sus funciones, la PDI cataliza la eliminación de los intermedios de plegamiento con entrecruzamientos de disulfuros inapropiados. La **péptido prolil cis-trans isomerasa (PPI)** cataliza la interconversión entre los isómeros cis y trans de los enlaces peptídicos de prolina (Fig. 4–7b), que puede ser una etapa lenta del proceso de plegamiento de proteínas que contienen algunos enlaces peptídicos de la prolina en la conformación cis.

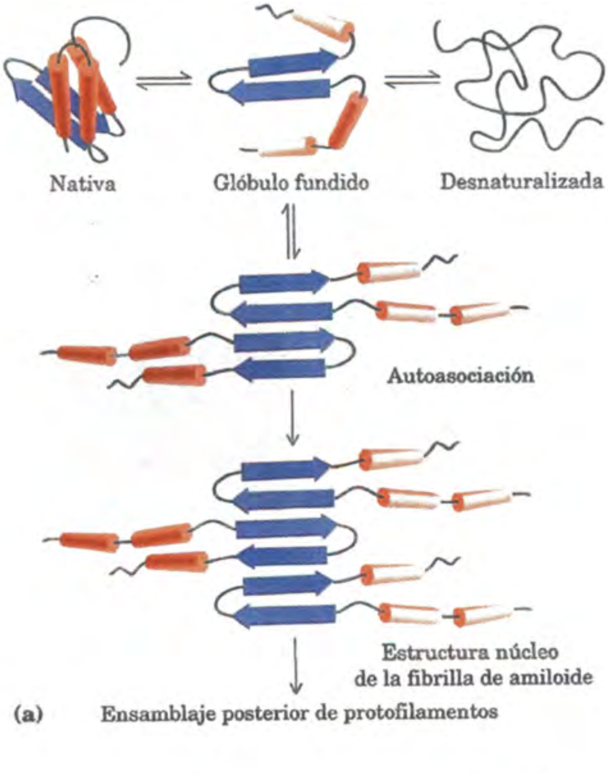
El plegamiento de proteínas es probablemente un proceso más complejo en el entorno celular densamente empaquetado que en el tubo de ensayo. Es posible que se descubran más clases de proteínas que facilitan el plegamiento.

Defectos en el plegamiento de proteínas pueden constituir la base molecular de una amplia gama de trastornos genéticos humanos

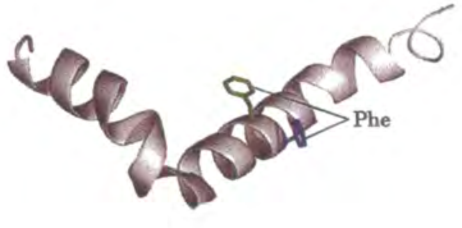
A pesar de que hay muchos procesos que colaboran en el plegamiento de las proteínas, algunas proteínas se pliegan erróneamente. De hecho, el mal plegamiento de proteínas es un problema importante en todas las células, por el que una cuarta parte o más de los polipéptidos sintetizados pueden ser destruidos a causa de su plegamiento incorrecto. En algunos casos, el plegamiento incorrecto contribuye al desarrollo de enfermedades graves.

Muchas enfermedades, entre las que se cuentan la diabetes del tipo 2 y las enfermedades de Alzheimer, de Huntington y de Parkinson, surgen de un mecanismo de plegamiento incorrecto común. En la mayoría de casos, una proteína que normalmente es secretada de la célula en forma soluble lo hace en un estado mal plegado y se convierte en una fibra **amiloide** insoluble extracelular. Estas enfermedades reciben el nombre colectivo de **amiloidosis.** Las fibras están muy ordenadas, con un diámetro de 7 a 10 nm y un grado elevado de estructura β. Las cadenas β están orientadas perpendicularmente al eje de la fibra. En algunas fibras amiloides la estructura global forma una larga hoja β de dos capas como la que se muestra para el péptido β-amiloide en la **Figura 4–31**.

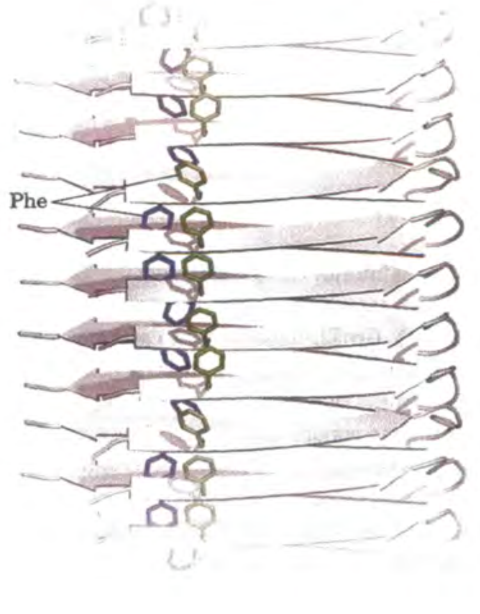
Muchas proteínas pueden adoptar la estructura fibrilar amiloide como alternativa a sus conformaciones globulares normales, y la mayoría de ellas concentran residuos aromáticos en una región central de hoja β. Las proteínas se secretan en una conformación parcialmente plegada. Antes de que el resto de la proteína se pliegue correctamente se forma el núcleo central de la hoja β (o alguna parte de él) y las hojas β de dos o más proteínas parcialmente plegadas se asocian para empezar a formar la fibra amiloide. La fibrilla crece en el espacio extracelular. Otras partes de la proteína se pliegan de modo diferente y se mantienen en el exterior del núcleo de hoja β de la fibrilla en crecimiento (Fig. 4–31a; el efecto estabilizante de los residuos aromáticos sobre la estructura se muestra en la Fig. 4–31c). La aparición de los síntomas de las amiloidosis suele ser muy lento porque la mayor parte de las proteínas se pliegan con normalidad. Los síntomas de la enfermedad pueden aparecer a edades más tempranas si



(a)



(b)



(c)

FIGURA 4–31 Formación de fibras amiloides patogénicas. **(a)** Las moléculas de proteína en cuya estructura normal hay regiones de estructura β se pliegan parcialmente. En un pequeño número de las moléculas antes de que se complete el plegamiento, las regiones en hoja β de un polipéptido se asocian con la misma región de otro polipéptido formando el núcleo de un amiloide. Otras moléculas de proteína adicionales se asocian lentamente con el amiloide y lo extienden para formar una fibrilla. **(b)** El péptido β-amiloide, que juega un papel importante en la enfermedad de Alzheimer, procede de una proteína transmembrana más grande llamada proteína precursora del péptido β-amiloide o APP. Esta proteína se encuentra en la mayoría de tejidos humanos. Cuando forma parte de una proteína mayor, el péptido está compuesto por dos segmentos en hélice α que abarcan la membrana. Cuando los dominios externo e interno (cada uno de los cuales tiene su función independiente) se separan por la acción de proteasas específicas, el péptido β-amiloide restante, relativamente estable, abandona la membrana y pierde su estructura en hélice α. A continuación puede empezar a formar lentamente fibras amiloides **(c)** que contribuyen a generar las placas características en el exterior del sistema nervioso de las personas con Alzheimer. El amiloide es rico en estructura en hoja β, con las cadenas β dirigidas perpendicularmente al eje de la fibrilla amiloide. En el péptido β-amiloide la estructura toma la forma de una hoja β paralela extendida de dos capas. En otros casos la forma adoptada es la de una hélice β levógira (véase la Fig. 4–21).

una persona hereda una mutación como por ejemplo la sustitución con un aminoácido aromático en una posición que favorece la formación de fibrillas amiloides. Una disminución en la capacidad de eliminar las proteínas mal plegadas también puede contribuir a la manifestación de estas enfermedades.

Algunas amiloidosis son sistémicas y afectan a varios tejidos. La amiloidosis sistémica primaria es causada por la deposición de fibrillas consistentes en cadenas ligeras de inmunoglobulinas (descritas en el Capítulo 5) mal plegadas o en fragmentos de cadenas ligeras derivadas de roturas proteolíticas. Los síntomas aparecen en promedio a los 65 años. Los pacientes sufren fatiga, ronquera, hinchazón y pérdida de peso, y muchos mueren dentro del primer año a partir del diagnóstico. Los órganos más afectados suelen ser el riñón y el corazón. Algunas amiloidosis se asocian con otras enfermedades. Las personas afectadas de ciertas enfermedades crónicas de tipo inflamatorio o infeccioso, tales como artritis reumatoide, tuberculosis, fibrosis quística y algunos tipos de cáncer, pueden experimentar un incremento agudo en la secreción de un polipéptido con tendencia a la agregación llamado proteína amiloide A sérica (SAA, por serum amyloid A protein). Esta proteína, o fragmentos de ella, se deposita en el tejido conjuntivo del bazo, riñón, hígado y alrededor del corazón. Las personas que sufren esta enfermedad, conocida como amiloidosis sistémica secundaria, presentan una amplia gama de síntomas, según sean los órganos afectados inicialmente. El resultado suele ser fatal en el término de unos pocos años. Se han asociado más de 80 amiloidosis con mutaciones en la transtirretina (una proteína que se une a hormonas tiroideas transportándolas y distribuyéndolas a través del cuerpo y del cerebro). Diferentes mutaciones de esta proteína dan lugar a deposición amiloide concentrada en diferentes tejidos, por lo que generan síntomas diferentes. También se han asociado amiloidosis con mutaciones heredadas en las proteínas lisozima, cadena α del fibrinógeno A y las apolipoproteínas A–I y A–II; todas ellas se describirán en capítulos posteriores.

Algunas enfermedades amiloides se asocian con órganos concretos. En estos casos, la proteína tendente a la formación de amiloides es secretada únicamente en el tejido afectado y su concentración local elevada da lugar a la deposición amiloide alrededor de este tejido (aunque una parte de la proteína puede tener una distribución sistémica). Un lugar habitual de deposición amiloide es cerca de las células β de los islotes pancreáticos, responsables de la secreción de insulina y de la regulación del metabolismo de la glucosa (p. 924). La secreción por parte de las células β de una pequeño péptido (de 37 aminoácidos) llamado polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) o amilina, puede producir la formación de depósitos amiloides alrededor de los islotes, destruyendo gradualmente las células. Un adulto sano tiene entre 1 millón y millón y medio de células pancreáticas β. Con su pérdida progresiva, la homeostasis de glucosa queda afectada y finalmente, cuando la pérdida celular llega al 50% o más, la enfermedad se transforma en una diabetes mellitus del tipo 2 (que aparece en adultos).

Las enfermedades con deposición amiloide que provocan neurodegeneración, en especial en adultos de edad avanzada, son un caso especial de amiloidosis localizadas. En la enfermedad de Alzheimer, la deposición de amiloide extracelular por las neuronas se debe a una proteína denominada péptido β-amiloide. Parece ser que estos depósitos son la causa primaria de la enfermedad de Alzheimer, pero un segundo tipo de agregación de tipo amiloide en el que interviene una proteína denominada tau también tiene lugar en el interior de las neuronas de pacientes afectados por la enfermedad. Las mutaciones hereditarias en la proteína tau no conducen al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer pero provocan demencia frontotemporal y parkinsonismo (una enfermedad parecida a la de Parkinson) que pueden resultar igual de devastadores.

Otras enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con la agregación intracelular de proteínas incorrectamente plegadas. En la enfermedad de Parkinson, la forma mal plegada

RECUADRO 4–6 MEDICINA Muerte por plegamiento incorrecto: enfermedades priónicas

Parece ser que un plegamiento incorrecto de una proteína es el agente causal de muchas enfermedades degenerativas raras del cerebro de mamíferos. Quizá la que mejor se conoce de éstas es la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, también denominada enfermedad de las vacas locas). Entre las enfermedades relacionadas se cuentan el kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos, el "scrapie" en ovejas y la enfermedad de debilitamiento crónico de ciervos y alces. Estas enfermedades a veces se conocen como encefalopatías espongiformes, denominadas así a causa de la frecuencia con que el cerebro enfermo está lleno de agujeros (Fig. 1). El deterioro progresivo del cerebro da lugar a un espectro de síntomas neurológicos que incluyen pérdida de peso, comportamiento errático, problemas posturales, de equilibrio y coordinación y pérdida de función cognitiva. Estas enfermedades son mortales.

En la década de 1960, los investigadores observaron la ausencia de ácidos nucleicos en las preparaciones de los agentes

(*continúa en la página siguiente*)

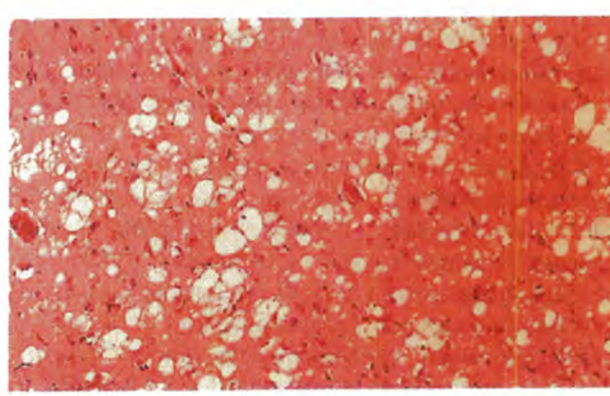


FIGURA 1 Sección teñida del córtex cerebral de un paciente con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob donde se muestra la degeneración espongiforme (vacuolar), la propiedad neurohistológica más característica. Las vacuolas amarillentas son intracelulares y se dan mayoritariamente en los procesos pre- y postsinápticos de las neuronas. En esta sección las vacuolas tienen de 20 a 100 μm de diámetro.

RECUADRO 4–6 MEDICINA **Muerte por plegamiento incorrecto: enfermedades priónicas** *(continuación de la página anterior)*

causantes de la enfermedad. Por aquel tiempo, Tikvah Alper sugirió que el agente era una proteína. Inicialmente, la idea pareció una herejía. Todos los agentes causantes de enfermedades conocidas hasta el momento –virus, bacterias, hongos, etc.– contenían ácidos nucleicos y su virulencia estaba relacionada con la reproducción genética y la propagación. Sin embargo, cuatro décadas de investigaciones, notablemente a cargo de Stanley Prusiner, han aportado pruebas de que las encefalopatías espongiformes son diferentes.

Se ha identificado el agente infeccioso como una única proteína (M_r 28.000), a la cual Prusiner apodó proteína **prión** (de *pr*oteinaceous *i*nfectious *on*ly o PrP). La proteína prión es un constituyente normal del tejido cerebral de todos los mamíferos. No se conoce con detalle su función, aunque podría tratarse de una proteína señalizadora. Los linajes de ratones a los que les falta el gen de PrP (y por consiguiente la propia proteína) parecen no sufrir los efectos de ninguna enfermedad. La enfermedad aparece sólo cuando la PrP celular normal o PrP^C se pliega en una conformación alterada denominada PrP^{Sc} (Sc indica "scrapie"). La interacción de PrP^{Sc} con PrP^C convierte a esta última en PrP^{Sc}, iniciándose un efecto dominó, por el que más y más proteína celular se convierte en la forma causante de la enfermedad. No se conoce el mecanismo por el que la presencia de PrP^{Sc} conduce a la encefalopatía espongiforme.

En las formas hereditarias de las enfermedades priónicas, una mutación en el gen que codifica PrP origina un cambio en un residuo aminoácido del que se cree que hace más probable la conversión de C^C en PrP^{Sc}. El conocimiento completo de las enfermedades priónicas necesita más información acerca de cómo la proteína prión afecta la función cerebral. La información estructural sobre la PrP está empezando a desvelar el proceso molecular que permite que las proteínas priónicas interaccionen para alterar su conformación (Fig. 2).

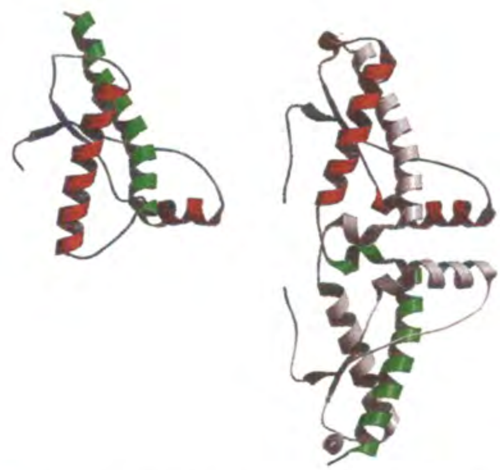


FIGURA 2 Estructura del dominio globular de la PrP humana en las formas monomérica (izquierda) y dimérica (derecha). La segunda subunidad se muestra en gris para destacar el importante cambio conformacional en la hélice α verde (ahora girada hacia abajo) al formarse el dímero entrelazado.

de la proteína α-sinucleína se agrega formando masas filamentosas esféricas denominadas cuerpos de Lewy. En la enfermedad de Huntington aparece la proteína huntingtina, que tiene una larga repetición de poliglutamina. En algunos individuos la repetición de poliglutamina es más larga de lo normal y ello da lugar a una forma más sutil de agregación intracelular. Se ha debatido mucho sobre la relación de algunas de estas enfermedades neurodegenerativas con las amiloidosis, pero se sabe que los agregados tienen un elevado grado de estructura β y son muy insolubles, lo que sugiere que existen estructuras y mecanismos de formación comunes entre ellas.

El plegamiento incorrecto de proteínas no necesita generar la formación de amiloides para ser patogénica. Por ejemplo, la fibrosis quística es debida a defectos en una proteína unida a membrana denominada **regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística** (CFTR en sus siglas en inglés), que actúa como un canal para el paso de los iones cloruro. La mutación más común entre las que causan la fibrosis quística es una deleción de un residuo Phe en la posición 508 de CFTR, que provoca el plegamiento incorrecto de la proteína. Como consecuencia de ello la mayor parte de la proteína se degrada, perdiéndose su función (véase el Recuadro 11–3). Muchas de las mutaciones relacionadas con las enfermedades del colágeno (p. 128) provocan también un plegamiento defectuoso. Un tipo especialmente destacable del plegamiento incorrecto de proteínas es el de las enfermedades priónicas (Recuadro 4–6). ■

RESUMEN 4.4 Desnaturalización y plegamiento de proteínas

- La estructura tridimensional y la función de las proteínas puede destruirse por desnaturalización, lo que demuestra la relación entre estructura y función. Algunas proteínas desnaturalizadas pueden renaturalizarse espontáneamente para formar proteínas biológicamente activas, lo que demuestra que la estructura terciaria de las proteínas está determinada por la secuencia de aminoácidos.
- Es probable que el plegamiento de proteínas en la célula implique la existencia de múltiples caminos. En un principio pueden formarse elementos de estructura secundaria, seguidos por la formación de estructuras supersecundarias. Los numerosos intermediarios de plegamiento evolucionan rápidamente hacia una única conformación nativa.
- Muchas proteínas reciben la asistencia de chaperonas Hsp70 y de chaperoninas en su plegamiento. Enzimas específicos catalizan la formación de enlaces disulfuro y la isomerización cis-trans de enlaces peptídicos de Pro.
- El plegamiento defectuoso de proteínas es la base molecular de una amplia gama de enfermedades humanas.

Palabras clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

Bibliografía

General

Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230.

El autor revisa su clásico trabajo sobre la ribonucleasa.

Branden, C. & Tooze, J. (1991) *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York.

Creighton, T.E. (1993) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Fuente completa y prestigiosa.

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52.**

Colección de excelentes artículos sobre muchos temas, entre los que se incluye la estructura, el plegamiento y la función de proteínas.

Kendrew, J.C. (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* **205** (December), 96–111.

Describe cómo se determinó la estructura de la mioglobina.

Richardson, J.S. (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Prot. Chem.* **34**, 167–339.

Resumen excelente, sobre modelos y principios estructurales de proteínas; la autora creó las tan útiles representaciones "en cinta" de las estructuras de proteínas.

Estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria

Beeby, M., O'Connor, B.D., Ryttersgaard, C., Boutz, D.R., Perry, L.J., & Yeates, T.O. (2005) The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS Biol.* **3**, e309.

Berman, H.M. (1999) The past and future of structure databases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 76–80.

Amplio resumen de los diferentes métodos utilizados en la catalogación de estructuras de proteínas.

Brenner, S.E., Chothia, C., & Hubbard, T.J.P. (1997) Population statistics of protein structures: lessons from structural classifications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 369–376.

Brown, J.H. (2006) Breaking symmetry in protein dimers: designs and function. *Protein Sci.* **15**, 1–13.

Fuchs, E. & Cleveland, D.W. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514–519.

McPherson, A. (1989) Macromolecular crystals. *Sci. Am.* **260** (March), 62–69.

Describe cómo se cristalizan macromoléculas tales como las proteínas.

Ponting, C.P. & Russell, R.R. (2002) The natural history of protein domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 45–71.

Explicación de cómo usar las bases de datos para explorar la evolución.

Prockop, D.J. & Kivirikko, K.I. (1995) Collagens, molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 403–434.

Desnaturalización de proteínas y plegamiento

Baldwin, R.L. (1994) Matching speed and stability. *Nature* **369**, 183–184.

Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., & Craig, E.A. (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119–122.

Un buen resumen sobre los mecanismos de las chaperonas.

Chiti, F. & Dobson, C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333–366.

Daggett, V. & Fersht, A.R. (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci.* **28**, 18–25.

Deuerling, E. & Bukau, B. (2004) Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 261–277.

Gazit, E. (2005) Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. *FEBS J.* **272**, 5971–5978.

Hoppener, J.W.M. & Lips, C.J.M. (2006) Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 726–736.

Luque, I., Leavitt, S.A., & Freire, E. (2002) The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 235–256.

Revisión acerca de cómo las variaciones en la estabilidad estructural de una proteína contribuyen a su función.

Prusiner, S.B. (1995) The prion diseases. *Sci. Am.* **272** (January), 48–57.

Un buen resumen acerca de las pruebas experimentales que condujeron a la hipótesis del prión.

Rose, G.D., Fleming, P.J., Banavar, J.R., & Maritan, A. (2006) A backbone-based theory of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 16,623–16,633.

Resumen bueno y accesible de las principales ideas en el campo, acompañado de ciertas especulaciones interesantes.

Selkoe, D.J. (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature* **426**, 900–904.

Un buen resumen sobre las amiloidosis.

Tang, Y., Chang, H., Roeben, A., Wischnewski, D., Wischnewski, N., Kerner, M., Hartl, F., & Hayer-Hartl, M. (2006) Structural features of the GroEL-GroES nano-cage required for rapid folding of encapsulated protein. *Cell* **125**, 903–914.

Westaway, D. & Carlson, G.A. (2002) Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 301–307.

Una buena revisión.

Problemas

1. Propiedades del enlace peptídico En los estudios por rayos X con péptidos cristalinos, Linus Pauling y Robert Corey encontraron que el enlace C—N del enlace peptídico tiene una longitud intermedia (1,32 Å) entre un enlace sencillo C—N típico (1,49 Å) y un doble enlace C=N (1,27 Å). También observa-

ron que el enlace peptídico es plano (los cuatro átomos unidos al grupo C—N se encuentran localizados en el mismo plano) y que los dos carbonos α unidos al C—N se encuentran siempre en posición trans (en lados opuestos del enlace peptídico):

(a) ¿Qué es lo que indica la longitud del enlace C—N en el enlace peptídico sobre su fortaleza y su orden de enlace, es decir, acerca de si es un enlace sencillo, doble o triple?

(b) ¿Qué nos dicen las observaciones de Pauling y Corey acerca de la facilidad de rotación alrededor del enlace peptídico C—N?

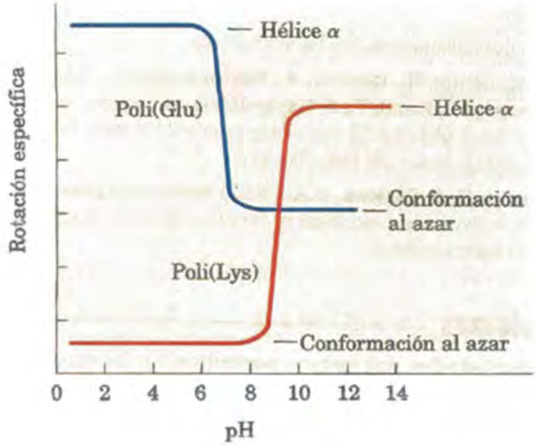
2. Relaciones estructurales y funcionales en las proteínas fibrosas William Astbury descubrió que el patrón de difracción de rayos X de la lana indica la presencia de unidades estructurales repetitivas separadas por una distancia de 5,2 Å en la dirección de la fibra de lana. Cuando se sometía la lana a la acción del vapor y al estiramiento, el patrón de difracción de rayos X mostraba una nueva unidad estructural repetitiva cada 7,0 Å. Si después de someter la lana a la acción del vapor y estirarla se la dejaba encoger de nuevo, el patrón obtenido se correspondía con el original, con una separación de aproximadamente 5,2 Å. A pesar de que estas observaciones proporcionaron claves importantes acerca de la estructura molecular de la lana, Astbury no pudo interpretarlas en aquel momento.

(a) Interprete las observaciones de Astbury a la luz de nuestros conocimientos actuales sobre la estructura de la lana.

(b) Cuando se lavan suéters o calcetines de lana en agua caliente o se calientan en una secadora, se encogen. Por otro lado, y en las mismas condiciones, la seda no encoge. Explíquelo.

3. Velocidad de síntesis de la α-queratina del cabello El cabello crece a una velocidad de 15 a 20 cm/año. Todo este crecimiento se concentra en la base de la fibra de cabello, donde los filamentos de α-queratina se sintetizan en el interior de las células epidérmicas vivas, para ser luego ensamblados y formar estructuras en forma de soga (véase la Fig. 4–10). El elemento estructural fundamental de la α-queratina es la hélice α, que tiene 3,6 residuos aminoácidos por vuelta y un desplazamiento de 5,4 Å por vuelta (véase la Fig. 4–4a). Considerando que la biosíntesis de las cadenas α-helicoidales de la queratina es el factor limitante de velocidad en el crecimiento del cabello, calcule la velocidad a la que deben formarse los enlaces peptídicos de las cadenas de α-queratina (enlaces peptídicos por segundo), para justificar el crecimiento anual observado.

4. Efecto del pH sobre la conformación de las estructuras secundarias α-helicoidales El desplegamiento de la hélice α de un polipéptido para dar lugar a una conformación desordenada viene acompañado por un gran descenso de una propiedad que se denomina rotación específica, una medida de la capacidad de una disolución para hacer girar el plano de la luz polarizada. El poliglutamato, un polipéptido formado únicamente por residuos de L-Glu, tiene una conformación helicoidal a pH 3. Sin embargo, al aumentar el pH a 7 se observa un gran descenso en la rotación específica de la disolución. De manera similar, la polilisina (residuos de L-Lys) es una hélice α a pH 10, pero su rotación específica también desciende al cambiar a pH 7, tal como se muestra en el gráfico de la primera columna. ¿Cuál es la explicación del efecto de los cambios de pH sobre las conformaciones de poli(Glu) y poli(Lys)? ¿Por qué se produce la transición en un margen tan estrecho de pH?



5. Los enlaces disulfuro determinan las propiedades de muchas proteínas Una cierta cantidad de proteínas naturales son muy ricas en enlaces disulfuro, y sus propiedades mecánicas (resistencia a la tensión, viscosidad, dureza, etc.) se correlacionan con el grado de formación de enlaces disulfuro.

(a) La glutenina, una proteína del trigo rica en enlaces disulfuro, es la responsable del carácter cohesivo y elástico de la masa elaborada con harina de trigo. De manera similar, la dureza y resistencia de los caparazones de tortuga es debida a la presencia muy abundante de enlaces disulfuro en su α-queratina. ¿Cuál es la base molecular de la correlación existente entre contenido en enlaces disulfuro y propiedades mecánicas de la proteína?

(b) La mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan y pierden su actividad cuando se calientan brevemente a 65 °C. Sin embargo, a menudo se observa que las proteínas globulares que contienen muchos enlaces disulfuro deben ser calentadas durante más tiempo y a mayor temperatura para desnaturalizarlas. Una de estas proteínas es el inhibidor pancreático bovino de la tripsina (BPTI), que tiene 58 residuos aminoácidos en una sola cadena y contiene tres enlaces disulfuro. Al enfriar una disolución de BPTI desnaturalizado, se recupera la actividad de la proteína. ¿Cuál es la base molecular de esta propiedad?

6. Secuencia de aminoácidos y estructura proteica Nuestro conocimiento cada vez mayor de cómo se pliegan las proteínas ha permitido a los investigadores establecer predicciones acerca de la estructura proteica basándose en los datos de la secuencia primaria de aminoácidos. Considere la siguiente secuencia de aminoácidos.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Ile – Ala – His – Thr – Tyr – Gly – Pro – Phe – Glu – Ala –

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Ala – Met – Cys – Lys – Trp – Glu – Ala – Gln – Pro – Asp –

21 22 23 24 25 26 27 28
Gly – Met – Glu – Cys – Ala – Phe – His – Arg

(a) ¿Dónde podría haber giros β?

(b) ¿En qué posiciones se podrían formar enlaces disulfuro intracatenarios?

(c) Teniendo en cuenta que esta secuencia es parte de una proteína globular más grande, indique la posible localización, ya sea en el interior de la proteína o en su superficie externa, de los siguientes residuos aminoácidos: Asp, Ile, Thr, Ala, Gln, Lys. Explique su razonamiento. (Pista: vea el índice de hidropatía en la Tabla 3–1.)

7. La bacteriorrodopsina en las proteínas de membrana púrpura En condiciones ambientales apropiadas, la arquea halófila denominada *Halobacterium halobium* sintetiza una proteína de membrana (M_r 26.000) conocida como bacteriorrodopsina, que es de color púrpura porque contiene retinal (véase la Fig. 10–21). Las moléculas de está proteína se agregan formando "manchas púrpura" en la membrana celular. La bacteriorrodopsina actúa como una bomba de protones activada por la

luz que proporciona energía para las funciones celulares. El análisis de esta proteína por rayos X indica que esta formada por siete segmentos de hélice α paralelos, cada uno de los cuales atraviesa la membrana de la célula bacteriana (de un grosor de 45 Å). Calcule el número mínimo de residuos aminoácidos necesario para que un segmento de hélice α atraviese completamente la membrana. Calcule la fracción de proteína bacteriorrodopsina que está implicada en las hélices que abarcan la membrana (utilice una masa media por residuo aminoácido de 110).

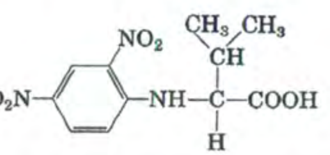
8. Terminología de estructura de proteínas. La mioglobina, ¿es un motivo, un dominio o una estructura tridimensional completa?

9. Efecto patogénico de la bacteria que provoca la gangrena gaseosa La bacteria anaeróbica *Clostridium perfringens* es altamente patogénica siendo responsable de la gangrena gaseosa, un estado que destruye la estructura del tejido animal. Esta bacteria secreta un enzima que cataliza con eficiencia la hidrólisis del enlace peptídico indicado en rojo en la secuencia:

$$\text{—X—Gly—Pro—Y—} \xrightarrow{H_2O} \text{—X—COO}^- + H_3\overset{+}{N}\text{—Gly—Pro—Y—}$$

donde X e Y son cualquiera de los 20 aminoácidos estándar. ¿De qué modo contribuye la secreción de este enzima a la invasividad de esta bacteria en los tejidos humanos? ¿Por qué este enzima no afecta a la propia bacteria?

10. Número de cadenas polipeptídicas en una proteína multisubunidad. Una muestra (660 mg) de una proteína oligomérica de M_r 132.000 se trató con un exceso de 1-flúor-2,4-dinitrobenceno (reactivo de Sanger) en condiciones ligeramente alcalinas hasta que se completó la reacción. Los enlaces peptídicos de la proteína se hidrolizaron a continuación completamente por ebullición en HCl concentrado. Se encontró que el hidrolizado contenía 5,5 mg del compuesto siguiente:



Sin embargo, no se encontraron derivados 2,4-dinitrofenílicos de los grupos α-amino de otros aminoácidos.

(a) Explique de qué modo puede usarse esta información para determinar el número de cadenas polipeptídicas en una proteína oligomérica.

(b) Calcule el número de cadenas polipeptídicas en esta proteína.

(c) ¿Qué otra técnica de análisis se puede utilizar para determinar si las cadenas polipeptídicas en esta proteína son iguales o diferentes?

11. Predicción de estructura secundaria ¿En cuál de los siguientes péptidos es más probable que se observe un plegamiento en hélice α y por qué?

(a) LKAENDEAARAMSEA

(b) CRAGGFPWDQPGTSN

12. Fibras amiloides y enfermedad Se ha observado que varias moléculas aromáticas pequeñas, como el rojo de fenol (usado como modelo farmacológico no tóxico), inhiben la formación de amiloide en modelos de laboratorio. Estos compuestos se investigan con el objetivo de encontrar un fármaco que pueda inhibir eficientemente la formación de amiloide en el cerebro de personas con enfermedad de Alzheimer incipiente.

(a) Sugiera una razón por la que las moléculas con sustituyentes aromáticos podrían impedir la formación de amiloide.

(b) Algunos investigadores han sugerido que un fármaco que se usa en el tratamiento del Alzheimer también podría ser efectivo en el tratamiento de la diabetes mellitus del tipo 2 (de aparición tardía). ¿Cuál podría ser la razón de que un mismo fármaco pudiera ser efectivo en el tratamiento de enfermedades tan distintas?

Bioquímica en Internet

13. Modelado de proteínas en Internet En un intento de identificar el agente causal de la enfermedad de Crohn (una enfermedad inflamatoria del intestino), se practicaron biopsias de mucosa intestinal a un grupo de pacientes. Se identificó una proteína que se expresaba a niveles más elevados en los pacientes con enfermedad de Crohn que en pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino no relacionadas o en controles no afectados. Se purificó la proteína y se obtuvo la siguiente secuencia *parcial* de aminoácidos (léase de izquierda a derecha):

EAELCPDRCI	HSFQNLGIQC	VKKRDLEQAI
SQRIQTNNNP	FQVPIEEQRG	DYDLNAVRLC
FQVTVRDPSG	RPLRLPPVLP	HPIFDNRAPN
TAELKICRVN	RNSGSCLGGD	EIFLLCDKVQ
KEDIEVYFTG	PGWEARGSFS	QADVHRQVAI
VFRTPPYADP	SLQAPVRVSM	QLRRPSDREL
SEPMEFQYLP	DTDDRHRIEE	KRKRTYETFK
SIMKKSPFSG	PTDPRPPPRR	IAVPSRSSAS
VPKPAPQPYP		

(a) Puede identificar esta proteína utilizando una base de datos de proteínas en Internet. Algunos sitios recomendables para empezar con el estudio son Protein Information Resource (PIR; pir.georgetown.edu), Structural Classification of Proteins (SCOP; http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop) y Prosite (http://expasy.org/prosite).

En la base de datos seleccionada, siga los enlaces para localizar el programa de comparación de secuencias. Introduzca unos 30 residuos de la secuencia de la proteína en el campo de búsqueda apropiado y envíelos para su análisis. ¿Qué información le proporciona este análisis acerca de la identidad de la proteína?

(b) Repita el procedimiento utilizando diferentes partes de la secuencia de aminoácidos de la proteína. ¿Obtiene siempre el mismo resultado?

(c) Diversas webs proporcionan información sobre la estructura tridimensional de las proteínas. Encuentre información acerca de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína, utilizando sitios de bases de datos tales como el Protein Data Bank (PDB; www.rcsb.org) o SCOP.

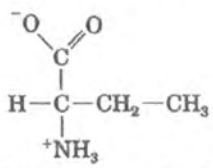
(d) Durante sus búsquedas en la Web ¿qué aprendió acerca de la función celular de la proteína?

Problema de análisis de datos

14. Proteínas como imágenes especulares Como se comentó en el Capítulo 3, "los residuos aminoácidos de las proteínas son exclusivamente estereoisómeros L". No está claro si esta selectividad es necesaria para el funcionamiento correcto de las proteínas o es un accidente evolutivo. Para estudiar esta cuestión, Milton y colaboradores (1992) publicaron un artículo sobre un enzima hecho enteramente de estereoisómeros de la serie D. Escogieron como enzima la proteasa del VIH, un enzima proteolítico producido por el VIH que convierte las preproteínas víricas inactivas en sus formas activas.

Anteriormente, Wlodawer y colaboradores (1989) habían publicado la síntesis química completa de la proteasa del VIH a partir de L-aminoácidos (el L-enzima), utilizando la metodología descrita en la Figura 3–29. La proteasa del VIH normal contiene 2 residuos de Cys en posiciones 67 y 95. Dado que la síntesis química de proteínas con Cys es técnicamente difícil, Wlodawer y sus colaboradores sustituyeron los dos residuos Cys de la proteína por el aminoácido sintético ácido L-α-amino-n-butírico (Aba). En palabras de los autores, esto se hizo para “reducir las dificultades sintéticas relacionadas con la desprotección de las Cys y para facilitar la manipulación del producto”.

(a) A continuación se muestra la estructura de Aba. ¿Cuál es la razón de que esta molécula fuera un buen sustituto de un residuo Cys? ¿Bajo qué circunstancias no lo sería?



Ácido L-α-amino-n-butírico

Wlodawer y colaboradores desnaturalizaron la proteína sintetizada disolviéndola en cloruro de guanidinio 6 M, y a continuación la dejaron plegar lentamente mediante eliminación del cloruro de guanidinio por diálisis frente a un tampón neutro (glicerol 10%, $NaPO_4$ 25 mM, pH 7).

(b) Hay muchas razones que permiten predecir que una proteína sintetizada, desnaturalizada y plegada de este modo no será activa. Dé tres de ellas.

(c) Curiosamente, la L-proteasa resultante era activa. ¿Qué le dice este resultado acerca del papel de los enlaces disulfuro en la proteasa del VIH nativa?

En su nuevo estudio, Milton y colaboradores sintetizaron la proteasa del VIH a partir de D-aminoácidos, utilizando el mismo protocolo que en el estudio anterior (Wlodawer y colaboradores). Formalmente, existen tres posibilidades para el plegamiento de la D-proteasa: podría dar lugar a (1) la misma estructura que la L-proteasa; (2) la imagen especular de la L-proteasa; o (3) alguna otra cosa, probablemente inactiva.

(d) Decida y defienda una respuesta para cada una de las posibilidades.

De hecho, la D-proteasa era activa: hidrolizaba un sustrato sintético y era inhibida por inhibidores específicos. Para examinar la estructura de los enzimas D y L, Milton y colaboradores determinaron la actividad de las dos formas con las formas D y L de un sustrato peptídico quiral y también estudiaron su inhibición con las formas D y L de un análogo peptídico quiral que actuaba como inhibidor. También se ensayó la inhibición de las dos formas a cargo del inhibidor no quiral Evans blue. En la tabla se expresan los resultados de los experimentos.

			Inhibición		
	Hidrólisis de sustrato		**Inhibidor peptídico**		**Evans blue**
Proteasa del VIH	**D-sustrato**	**L-sustrado**	**D-inhibidor**	**L-inhibidor**	**(aquiral)**
L-proteasa	−	+	−	+	+
D-proteasa	+	−	+	−	+

(e) ¿Cuál de los tres modelos propuestos es respaldado por estos datos? Explique su razonamiento.

(f) El compuesto Evans blue inhibe las dos formas de la proteasa. ¿Por qué?

(g) ¿Esperaría que la quimotripsina digiriera la D-proteasa? Explique su razonamiento.

(h) ¿Esperaría que la síntesis total a partir de D-aminoácidos generara enzima activo para cualquier tipo de enzima? Explique su razonamiento.

Referencias

Milton, R.C., Milton, S.C., & Kent, S.B. (1992) Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show demonstration of reciprocal chiral substrate specificity. *Science* **256**, 1445–1448.

Wlodawer, A., Miller, M., Jaskólski, M., Sathyanarayana, B.K., Baldwin, E., Weber, I.T., Selk, L.M., Clawson, L., Schneider, J., & Kent, S.B. (1989) Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* **245**, 616–621.

5

> Puesto que las proteínas participan de un modo u otro en todos los procesos químicos de un organismo vivo, se podría esperar que la elucidación de sus estructuras y de sus transformaciones permitiera obtener información altamente significativa para el ámbito de la química biológica.
>
> —*Emil Fischer, artículo en* Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin, *1906*

Función de las proteínas

El conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína es un paso importante para poder entender cómo funciona. Sin embargo, la estructura bidimensional estática que se muestra sobre una página tiene poco que ver con la realidad. Las proteínas son moléculas dinámicas cuyas funciones dependen, de modo casi invariable, de las interacciones con otras moléculas. Estas interacciones se ven afectadas por cambios, a veces espectaculares y otras sutiles, de la conformación proteica que pueden desencadenar importantes efectos fisiológicos. En este capítulo estudiaremos cómo interaccionan las proteínas con otras moléculas y cómo se relacionan estas interacciones con la estructura dinámica de las proteínas. Es muy difícil sobreestimar la importancia de las interacciones moleculares para la función proteica. Como vimos en el Capítulo 4, la función de las proteínas fibrosas como elementos estructurales de las células y los tejidos, se basa en interacciones cuaternarias estables entre cadenas polipeptídicas idénticas. En este capítulo veremos que las funciones de otras muchas proteínas implican interacciones con una variedad de moléculas diferentes. La mayoría de estas interacciones son transitorias, a pesar de que pueden constituir la base de complejos procesos fisiológicos, tales como el transporte de oxígeno, la función inmunitaria y la contracción muscular, los temas que examinamos con detalle en este capítulo. Las proteínas que llevan a cabo estos procesos ilustran los principios fundamentales de la función proteica que se explican a continuación, algunos de los cuales resultarán familiares del capítulo anterior:

> Las funciones de muchas proteínas implican la unión reversible de otras moléculas. Una molécula unida de manera reversible por una proteína se conoce con el nombre de **ligando.** Un ligando puede ser cualquier tipo de molécula, incluidas otras proteínas. La naturaleza transitoria de las interacciones proteína–ligando es crítica para la vida, ya que permiten al organismo responder de manera rápida y reversible al medio ambiente cambiante y a las circunstancias metabólicas.
>
> El ligando se une a un lugar de la proteína llamado **sitio de fijación,** que es complementario al ligando en tamaño, forma, carga y carácter hidrofóbico o hidrofílico. Además, la interacción es específica: la proteína puede discriminar entre las miles de moléculas diferentes de su entorno y unir selectivamente sólo una o unas pocas. Una proteína puede tener diferentes sitios de fijación para diferentes ligandos. Estas interacciones moleculares específicas son cruciales para mantener el alto grado de orden de un sistema vivo. (Esta discusión excluye la unión de agua, que puede interaccionar débilmente y de manera no específica con diferentes partes de una proteína. En el Capítulo 6 se estudia el agua como un ligando específico para muchos enzimas.)
>
> Las proteínas son flexibles. Los cambios en su conformación pueden ser sutiles, reflejando vibraciones moleculares y pequeños movimientos de los residuos de aminoácidos a lo largo de la proteína. De una proteína que se flexiona de este modo se dice a veces que "respira". Los cambios en la conformación pueden ser también muy grandes, con segmentos importantes de la estructura de la proteína desplazándose incluso varios nanómetros. Ciertos cambios específicos de la conformación acostumbran a ser esenciales para la función proteica.
>
> La unión de una proteína con un ligando está asociada con un cambio conformacional que hace que el sitio de fijación sea más complementario al ligando, lo que permite una unión más fuerte. La adaptación estructural que se produce entre la proteína y el ligando se llama **encaje inducido.**
>
> En una proteína con varias subunidades, un cambio de conformación en una subunidad afecta a menudo a la conformación de las otras subunidades.
>
> Las interacciones entre ligandos y proteínas pueden ser reguladas, habitualmente mediante interacciones específicas con uno o más ligandos adicionales. Estos otros ligandos pueden provocar cambios conformacionales que afecten a la unión del primer ligando.

Los enzimas representan un caso especial en la función proteica. Los enzimas unen y transforman químicamente otras moléculas: catalizan reacciones. Las moléculas sobre las que actúan los enzimas se llaman **sustratos** de la reacción, en lugar de ligandos, y el sitio de fijación del ligando se llama **sitio catalítico** o **sitio activo.** En este capítulo insistiremos sobre las funciones no catalíticas de las proteínas. En el Capítulo 6 trataremos la catálisis enzimática, un tema central en bioquímica. Veremos como el tratamiento de los temas de este capítulo (unión, especificidad y cambios de conformación) continúan en el próximo capítulo, con el elemento añadido de que las proteínas actuarán en transformaciones químicas.

5.1 Unión reversible de una proteína a un ligando: proteínas de unión a oxígeno

La mioglobina y la hemoglobina son posiblemente las dos proteínas más estudiadas y mejor conocidas. Fueron las primeras de las que se determinó su estructura tridimensional, y con estas dos moléculas se ilustran casi todos los aspectos de uno de los procesos bioquímicos más importantes: la unión reversible de un ligando a una proteína. Este modelo clásico de la función proteica nos dará una gran cantidad de información sobre cómo trabajan las proteínas. **Proteínas de unión a oxígeno – Mioglobina: almacenamiento de oxígeno**

El oxígeno puede estar unido a un grupo prostético hemo

El oxígeno no es muy soluble en el agua (véase la Tabla 2–3) y no puede transportarse a los tejidos en cantidad suficiente por simple disolución en el suero sanguíneo. La difusión del oxígeno a través de los tejidos es también insuficiente a lo largo de distancias superiores a pocos milímetros. La evolución de animales multicelulares grandes dependió de la evolución de proteínas que pudiesen transportar y almacenar oxígeno. Sin embargo, ninguna de las cadenas laterales de los aminoácidos proteicos es adecuada para la unión reversible de moléculas de oxígeno. Este papel es desempeñado por ciertos metales de transición, entre ellos el hierro y el cobre, que tienen una fuerte tendencia a unir oxígeno. Los organismos multicelulares explotan las propiedades de los metales, normalmente del hierro, para el transporte de oxígeno. Sin embargo, el hierro libre provoca la formación de especies altamente reactivas del oxígeno, tales como los radicales hidroxilo, que pueden dañar el DNA u otras macromoléculas. Por lo tanto, el hierro utilizado en las células está presente en formas que lo secuestran, lo hacen menos reactivo o las dos cosas a la vez. En los organismos multicelulares, especialmente en aquellos en los que el hierro, en su calidad de transportador de oxígeno, debe ser transportado a lo largo de grandes distancias, el hierro suele estar incorporado a un grupo prostético unido a una proteína, llamado grupo **hemo.** (Recuerde que en el Capítulo 3 vimos que un grupo prostético es un compuesto asociado permanentemente a una proteína y que contribuye a su función.)

El grupo hemo tiene una estructura de anillo orgánico complejo, **protoforpirina,** al cual está unido un único átomo de hierro en su estado ferroso (Fe^{2+}) **(Fig. 5–1)**. El átomo de hierro tiene seis enlaces de coordinación, cuatro con átomos de nitrógeno que forman parte del sistema plano del **anillo de porfirina** y dos perpendiculares a la porfirina. Los átomos de nitrógeno coordinados (que tienen carácter de dadores de electrones) ayudan a evitar la conversión del hierro hemo al estado férrico (Fe^{3+}). El hierro en estado Fe^{2+} une oxígeno de manera reversible, mientras que en el estado Fe^{3+} no une oxígeno. El grupo hemo se encuentra en muchas proteínas transportadoras de oxígeno, y también en algunas proteínas, como los citocromos, que participan en reacciones de oxidación–reducción (transferencia de electrones) (Capítulo 19).

Las moléculas de hemo libres (no unidas a proteínas), dejan el Fe^{2+} con dos enlaces de coordinación "abiertos". La reacción simultánea de una molécula de O_2 con dos moléculas de hemo libres (o con dos Fe^{2+} libres) puede dar lugar a la conversión irreversible del Fe^{2+} a Fe^{3+}. En las proteínas que contienen el hemo, esta reacción se evita secuestrando cada grupo hemo en un lugar suficientemente profundo dentro de la estructura

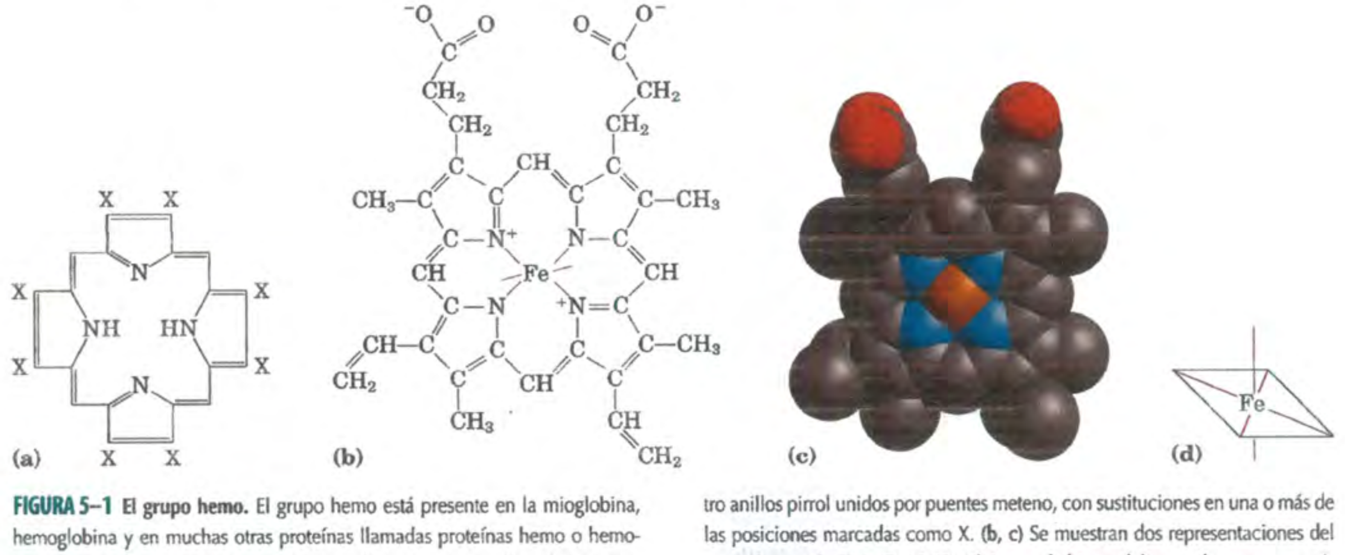


FIGURA 5–1 El grupo hemo. El grupo hemo está presente en la mioglobina, hemoglobina y en muchas otras proteínas llamadas proteínas hemo o hemoproteínas. El grupo hemo consiste en un anillo orgánico complejo, la protoporfirina IX, al cual se une un átomo de hierro en su estado ferroso (Fe^{2+}). **(a)** Las porfirinas, de las que la protoporfirina IX es sólo un ejemplo, consisten en cuatro anillos pirrol unidos por puentes meteno, con sustituciones en una o más de las posiciones marcadas como X. **(b, c)** Se muestran dos representaciones del grupo hemo (de PDB ID 1CCR). El átomo de hierro del grupo hemo posee seis enlaces de coordinación: cuatro de ellos unidos al anillo plano de la porfirina y en su mismo plano, y **(d)** otros dos perpendiculares a este plano.

FIGURA 5–2 Vista lateral del grupo hemo. Esta perspectiva muestra los dos enlaces de coordinación del Fe^{2+} perpendiculares al sistema del anillo porfirina. Uno de estos dos enlaces está ocupado por un residuo His, a veces llamada His próxima; el otro es el sitio de fijación del oxígeno. Los cuatro enlaces de coordinación restantes están unidos al sistema de anillo porfirínico y se encuentran en el mismo plano.

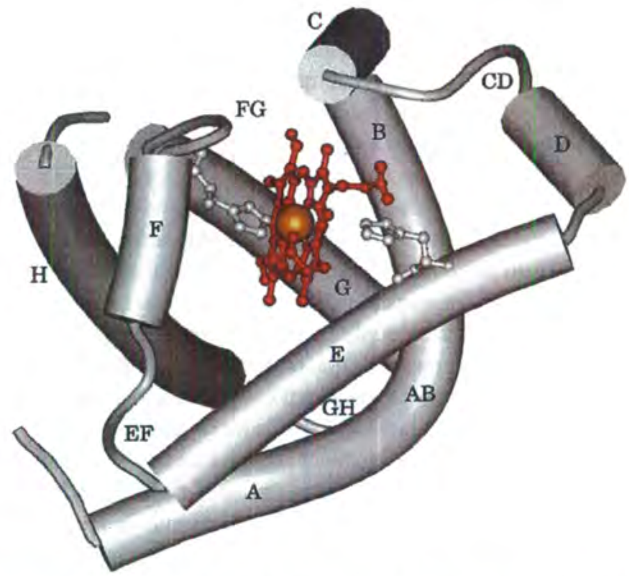


FIGURA 5–3 Mioglobina. (PDB ID 1MBO) Los ocho segmentos de hélice α (mostrados aquí como cilindros) están marcados de la A a la H. Los residuos de conexión, que no forman parte de las hélices, se nombran como AB, CD, EF..., indicando los segmentos que interconectan. Algunos giros, tales como BC y DE, son abruptos, y no contienen residuos; normalmente no hay un nombre específico para ellos. (El segmento corto visible entre D y E es un artefacto de la representación por ordenador.) El grupo hemo está unido a una bolsa formada principalmente por las hélices E y F, aunque también participan algunos aminoácidos de otros segmentos.

proteica. Así, el acceso a los dos enlaces de coordinación abiertos está restringido. Uno de esos dos enlaces de coordinación está ocupado por el nitrógeno de la cadena lateral de un residuo His. El otro es el sitio de fijación del oxígeno molecular (O_2) **(Fig. 5–2)**. Las propiedades electrónicas del hierro del grupo hemo cambian cuando se une el oxígeno, provocando el cambio de color de la sangre desde el púrpura oscuro de la sangre venosa sin oxígeno al rojo brillante de la sangre arterial rica en oxígeno. Algunas moléculas pequeñas, como el monóxido de carbono (CO) y el óxido nítrico (NO) pueden coordinarse con el hierro del grupo hemo con mayor afinidad que el O_2. Cuando una molécula de CO se une al grupo hemo el O_2 queda excluido, siendo ésta la razón por la que el CO es altamente tóxico para los organismos aeróbicos (como se puede ver en el Recuadro 5–1). Las proteínas de unión a oxígeno regulan el acceso del CO y otras moléculas pequeñas al hierro del grupo hemo mediante el secuestro e inclusión del grupo hemo en su estructura.

La mioglobina tiene un único sitio de fijación para el oxígeno

La mioglobina (M_r 16.700; abreviada Mb) es una proteína de unión a oxígeno relativamente simple y que está presente en prácticamente todos los mamíferos, sobre todo en el tejido muscular. Al ser una proteína de transporte, facilita la difusión del oxígeno en el músculo. Es especialmente abundante en el músculo de los animales que se sumergen, tales como focas y ballenas, que deben almacenar suficiente oxígeno para estancias prolongadas bajo el mar. Hay proteínas muy similares a la mioglobina que están ampliamente distribuidas, presentes incluso en algunos organismos unicelulares.

La mioglobina consta de un único polipéptido de 153 aminoácidos con una molécula de hemo. Es un ejemplo típico de la familia de proteínas llamadas **globinas,** que poseen estructuras primarias y terciarias similares. El polipéptido está formado por ocho segmentos de hélice α conectados por giros **(Fig. 5–3)**. Alrededor de un 78% de los residuos aminoácidos presentes en la proteína se encuentran en estas hélices α.

Cualquier discusión detallada sobre la función de una proteína implica inevitablemente su estructura. La introducción de algunas convenciones estructurales propias de las globinas facilitará nuestro tratamiento de la mioglobina. Tal como se ve en la Figura 5–3, los segmentos helicoidales se nombran de la A a la H. Un residuo aminoácido individual puede designarse por su posición en la secuencia de aminoácidos o por su localización dentro de la secuencia de un segmento concreto de hélice α. Por ejemplo, el residuo His coordinado al grupo hemo en la mioglobina, His^{93} (el aminoácido nº 93 desde el extremo amino-terminal de la secuencia polipeptídica de la mioglobina) se llama también HisF8 (el 8º residuo de la hélice α F). Los giros en la estructura se denominan AB, CD, EF, FG, etc., indicando los segmentos de hélice α que conectan.

Las interacciones proteína-ligando se pueden describir cuantitativamente

La función de la mioglobina depende no sólo de la capacidad de la proteína de unir oxígeno, sino también de ser capaz de liberarlo cuando y donde sea necesario. La función bioquímica depende a menudo de una interacción reversible proteína–ligando de este tipo. Una descripción cuantitativa de esta interacción es, por tanto, un aspecto clave en muchas investigaciones bioquímicas.

En general, la unión reversible de una proteína (P) a un ligando (L) puede describirse por una simple **expresión de equilibrio:**

$$P + L \rightleftharpoons PL \qquad (5\text{–}1)$$

La reacción se caracteriza por una constante de equilibrio K_a, de manera que

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \qquad (5\text{–}2)$$

donde k_a y k_d son constantes de velocidad (insistiremos en ellos más adelante). El término K_a es una **constante de asociación** (no hay que confundirla con la K_a que representa la constante de disociación de un ácido; p. 58) que describe el equilibrio entre el complejo y sus componentes libres no unidos. La constante de asociación proporciona una medida de la afinidad del ligando L por la proteína. La K_a tiene unidades de M^{-1}; un valor más alto de K_a corresponde a una mayor afinidad del ligando.

El término del equilibrio K_a es también equivalente a la relación entre las velocidades de reacción hacia la derecha (asociación) y hacia la izquierda (disociación) relacionadas con la formación del complejo PL. La velocidad de asociación se describe con la constante de velocidad k_a y la de disociación con la constante de velocidad k_d. Como se discutirá en el capítulo siguiente, las constantes de velocidad son constantes de proporcionalidad que describen la fracción del total de reactivo que reacciona en una fracción de tiempo determinada. Cuando en la reacción interviene una sola molécula, como en la disociación PL → P + L, la reacción es de *primer orden* y las unidades de la constante de velocidad (k_d) se expresan como inversos del tiempo (s^{-1}). Cuando en la reacción intervienen dos moléculas, como en la reacción de asociación P + L → PL, se llama de *segundo orden* y las unidades de su constante de velocidad (k_a) son $M^{-1}s^{-1}$.

CONVENCIÓN CLAVE: Las constantes de equilibrio se representan con una *K* y las constantes de velocidad con una *k*. ■

La redistribución de la primera parte de la ecuación 5–2 muestra que la relación entre proteína unida y proteína libre es directamente proporcional a la concentración de ligando libre:

$$K_a[L] = \frac{[PL]}{[P]} \qquad (5\text{–}3)$$

Cuando la concentración de ligando es mucho mayor que la concentración de sitios de fijación de ligando, la unión de ligando por parte de la proteína no afecta de manera significativa a la concentración de ligando libre (no unido), con lo que [L] permanece constante. Esta situación es aplicable en general a la mayoría de ligandos que se unen a las proteínas en las células y simplifica nuestra descripción del equilibrio de unión.

Podemos ahora considerar la constante de equilibrio en función de la fracción, θ (teta), de sitios de fijación de ligando de la proteína que están ocupados por el ligando:

$$\theta = \frac{\text{sitios de fijación ocupados}}{\text{sitios de fijación totales}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]} \qquad (5\text{–}4)$$

Sustituyendo K_a[L][P] por [PL] (véase la ecuación 5–3) y reorganizando los términos tenemos:

$$\theta = \frac{K_a[L][P]}{K_a[L][P] + [P]} = \frac{K_a[L]}{K_a[L] + 1} = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}} \qquad (5\text{–}5)$$

El término K_a puede ser determinado a partir de una representación de θ frente a la concentración de ligando libre, [L] (**Fig. 5–4a**). Cualquier ecuación de la forma $x = y/(y+z)$ describe una hipérbole, por lo que θ es una función hiperbólica de [L]. La fracción de sitios de fijación de ligando ocupados tiende a la saturación de manera asintótica al aumentar [L].

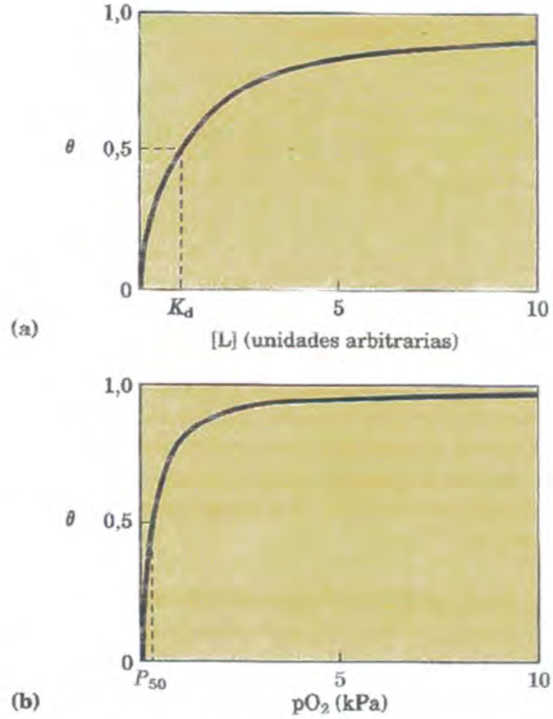


FIGURA 5–4 Representaciones gráficas de la unión de ligando. Se representa a proporción de centros de unión a ligando ocupados, θ, frente a la concentración de ligando libre. Ambas curvas son hipérbolas rectangulares. (a) Curva hipotética de unión a un ligando L. La [L] necesaria para ocupar la mitad de los centros de unión a ligando disponibles es equivalente a $1/K_a$ o K_d. La curva tiene una asíntota horizontal en $\theta = 1$ y una asíntota vertical (no mostrada) en [L] = $-1/K_a$. (b) Curva representativa de la unión de oxígeno a la mioglobina. La presión parcial de O_2 en el aire sobre la solución se expresa en kilopascales (kPa). El oxígeno se une con fuerza a la mioglobina con una P_{50} de sólo 0,26 kPa.

La [L] a la que la mitad de los sitios de fijación de ligando disponibles están ocupados (es decir, θ = 0,5) corresponde a $1/K_a$.

Sin embargo, a veces es más frecuente (e intuitivamente más sencillo) considerar la **constante de disociación, K_d**, que es el recíproco de K_a ($K_d = 1/K_a$) y que se expresa en unidades de concentración molar (M). K_d es la constante de equilibrio para la liberación del ligando. Las ecuaciones cambian a:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a} \qquad (5\text{–}6)$$

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d} \qquad (5\text{–}7)$$

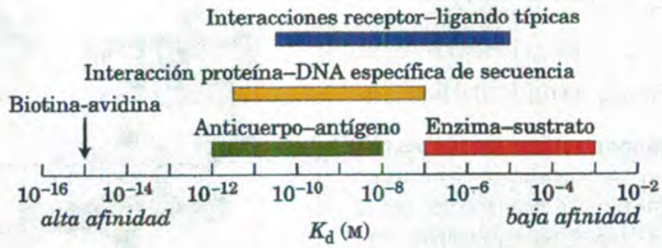
$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d} \qquad (5\text{–}8)$$

Cuando [L] es igual a K_d la mitad de los sitios de fijación de ligando están ocupados. Cuando [L] desciende por debajo de K_d, cada vez hay menos proteína con ligando unido. Para que un 90% de los sitios de fijación de ligando disponibles estén ocupados, [L] debe ser nueve veces mayor que K_d.

En la práctica, K_d se utiliza mucho más a menudo que K_a para expresar la afinidad de una proteína por su ligando. Observe que un valor más bajo de K_d corresponde a una mayor afinidad del ligando por la proteína. Las operaciones matemáticas pueden reducirse a frases simples: K_d equivale a la concentración molar de ligando a la cual la mitad de los sitios de fijación

TABLA 5–1 Constantes de disociación para algunas proteínas

Proteína	Ligando	K_d (M)*
Avidina (clara de huevo)	Biotina	1×10^{-15}
Receptor de insulina (humano)	Insulina	1×10^{-10}
Inmunoglobulina anti-VIH (humana)†	gp41 (prot. de superficie del VIH-1)	4×10^{-10}
Proteína de unión a níquel (*E. coli*)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Calmodulina (rata)‡	Ca^{2+}	3×10^{-6}
		2×10^{-5}



Las barras coloreadas indican el intervalo de valores de las constantes de disociación de diversas clases de interacciones en sistemas biológicos. Unas pocas interacciones, como la de la proteína avidina y el cofactor enzimático biotina, caen fuera de los márgenes normales. La interacción avidina-biotina es tan fuerte que se considera irreversible. Las interacciones proteína-DNA dirigidas por la secuencia se refieren a proteínas que se unen a una secuencia particular de nucleótidos en el DNA, en contraste con la unión general a cualquier sitio del DNA.

*La constante de disociación citada es válida tan sólo para las condiciones de disolución en las cuales fue determinada. Los valores de K_d para una interacción proteína ligando pueden ser alterados, en ocasiones en varios órdenes de magnitud, por cambios en variables de la solución tales como la concentración de sales, el pH u otras variables.

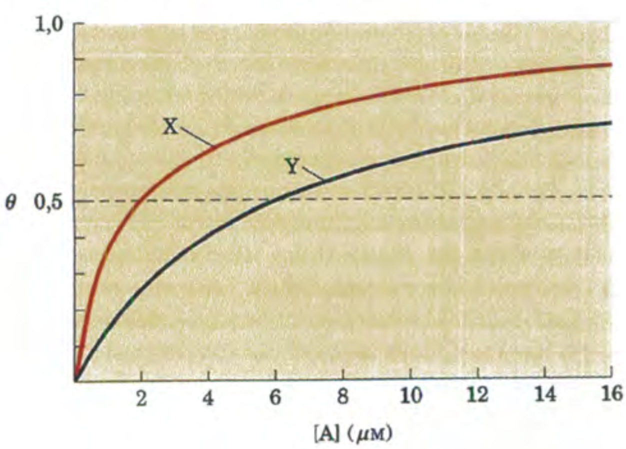
†Esta inmunoglobulina fue aislada en el intento del desarrollo de una vacuna frente al VIH. Las inmunoglobulinas (descritas en este capítulo) son altamente variables, y la K_d citada aquí no debe considerarse característica de todas las inmunoglobulinas.

‡La calmodulina tiene cuatro sitios de fijación para el calcio. Los valores mostrados reflejan los sitios de fijación de menor y mayor afinidad observados en una serie de medidas.

de ligando disponibles están ocupados. En este punto, se dice que la proteína ha alcanzado su punto medio de saturación con respecto a la unión de ligando. Cuanto más fuerte es la unión de una proteína a su ligando, menor será la concentración de ligando requerida para que estén ocupados la mitad de los sitios de fijación, y por tanto menor será el valor de K_d. En la tabla 5–1 se proporcionan algunas constantes de disociación significativas; la escala muestra el intervalo de valores observado normalmente par las constantes de disociación en sistemas biológicos.

EJEMPLO PRÁCTICO 5–1 Constantes de disociación receptor-ligando

Dos proteínas X e Y se unen al mismo ligando A, y presentan las curvas de unión que se muestran a continuación.



¿Cuál es la constante de disociación, K_d, para cada proteína? ¿Qué proteína (X o Y) tiene mayor afinidad por A?

Solución: Podemos determinar las constantes de disociación examinando la gráfica. Ya que θ representa la fracción de sitios de fijación ocupados por el ligando, la concentración de ligando a la que están ocupados la mitad de los sitios, es decir, el punto en el que la curva de fijación cruza la línea donde $\theta = 0,5$, es la constante de disociación. Para X, $K_d = 2\ \mu$M; para Y, $K_d = 6\ \mu$M. Al llegar al punto medio de saturación por [A] a valores más bajos, X tiene mayor afinidad por el ligando.

La unión de oxígeno a la mioglobina sigue los patrones descritos anteriormente. Sin embargo, al ser el oxígeno un gas, debemos hacer algunos ajustes mínimos en las ecuaciones para poder proceder con más facilidad a los experimentos necesarios. En primer lugar sustituimos la concentración de oxígeno disuelto por [L] en la ecuación 5–8 para tener

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d} \qquad (5\text{–}9)$$

Como para cualquier ligando, K_d es igual a la $[O_2]$ a la que están ocupados la mitad de los sitios de fijación de ligando disponibles, o $[O_2]_{0,5}$. La ecuación 5–9 pasa a ser

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + [O_2]_{0,5}} \qquad (5\text{–}10)$$

En los experimentos en los que el oxígeno es el ligando, el parámetro que varía es la presión parcial de oxígeno (pO_2) en la fase gaseosa que se encuentra sobre la disolución debido a que es más fácil de medir que la concentración de oxígeno disuelto. La concentración de una sustancia volátil en disolución es siempre proporcional a la presión parcial local en la fase gaseosa. Si definimos la presión parcial de oxígeno a $[O_2]_{0,5}$ como P_{50}, la sustitución en la ecuación 5–10 da

$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}} \tag{5–11}$$

Una curva de unión para la mioglobina que relaciona θ con pO_2 se muestra en la Figura 5–4b.

La estructura proteica afecta al modo de unión del ligando

La unión de un ligando a una proteína no acostumbra a ser tan simple como podrían hacer pensar las ecuaciones vistas anteriormente. La interacción se ve afectada en gran medida por la estructura proteica y suele estar acompañada por cambios conformacionales. Por ejemplo, la especificidad con la que el grupo hemo se une a sus diversos ligandos se ve alterada cuando el hemo es un componente de la mioglobina. El monóxido de carbono se une unas 20.000 veces mejor que el O_2 a las moléculas libres de grupo hemo (es decir, la K_d o P_{50} para la unión del CO es más de 20.000 veces menor que la del O_2) pero se une tan solo unas 200 veces mejor que el O_2 cuando el grupo hemo está unido a la mioglobina. La diferencia se explica en parte por un impedimento estérico. Cuando el O_2 se une al grupo hemo libre, el eje de la molécula de oxígeno forma un ángulo respecto al enlace Fe–O **(Fig. 5–5a)**. Por el contrario, cuando el CO se une al hemo libre, los átomos de Fe, C y O se sitúan en línea recta (Fig. 5–5b). En ambos casos, la unión refleja la geometría de orbitales híbridos de cada ligando. En la mioglobina la His^{64} (His E7) del sitio de fijación de O_2 del hemo está demasiado lejos para coordinarse con el hierro hemo, pero interacciona con un ligando unido al grupo hemo. Este residuo, llamado *His distal* (distinta de la *His próxima*, His F8), forma un enlace de hidrógeno con el O_2 (Fig. 5–5c) pero puede impedir la formación del enlace lineal del CO, dando así una explicación para la disminución selectiva de la unión del CO al hemo de la mioglobina (y de la hemoglobina). La reducción en la unión del CO es importante fisiológicamente, debido a que el CO es un subproducto de baja concentración del metabolismo celular. Otros factores, no bien definidos aún, parecen intervenir en la modulación de la interacción del hemo con el CO en estas proteínas.

La unión del O_2 al hemo en la mioglobina también depende de movimientos moleculares, o "respiración", en la estructura proteica. La molécula de hemo está profundamente sepultada en el polipéptido plegado, sin que haya un camino directo para el oxígeno desde la disolución hasta el sitio de fijación de ligando. Si la proteína fuese rígida, el O_2 no podría entrar o salir de la bolsa de hemo a una velocidad significativa. Sin embargo, la rápida flexión molecular de las cadenas laterales de los aminoácidos provoca la formación de cavidades transitorias en la estructura de la proteína, de manera que el O_2 puede abrirse paso moviéndose a través de esas cavidades. Las simulaciones por ordenador de las rápidas fluctuaciones estructurales de la mioglobina sugieren que hay muchos caminos para el oxígeno.

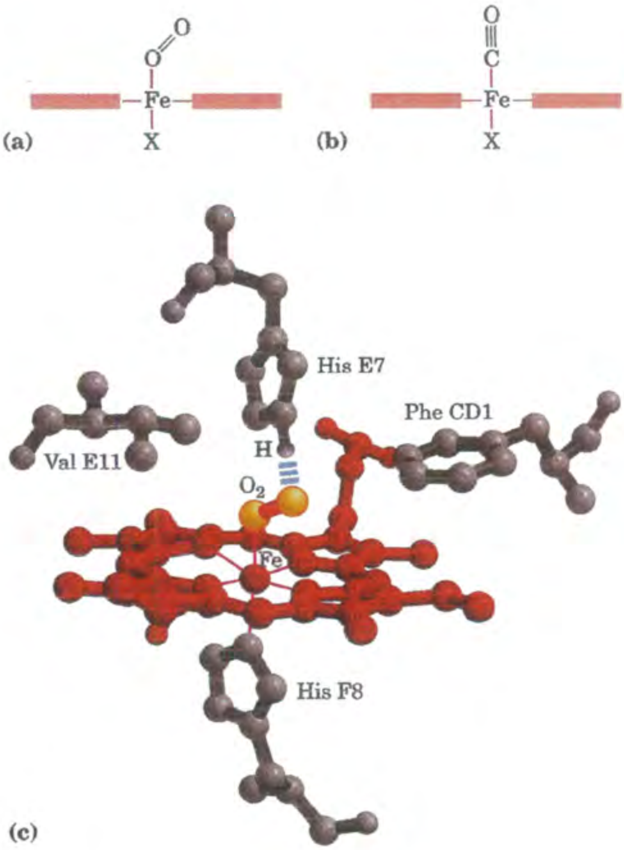


FIGURA 5–5 Efectos estéricos causados por la unión de ligando al grupo hemo de la mioglobina. **(a)** El oxígeno se une al grupo hemo con el eje del O_2 en ángulo, una conformación del enlace facilitada por la mioglobina. **(b)** El monóxido de carbono se une al hemo libre con el eje del CO perpendicular al plano del anillo de porfirina. Cuando se une al hemo en la mioglobina, el CO está forzado a adoptar un ligero ángulo debido a que la disposición perpendicular está bloqueada estéricamente por la His E7, la His distal. Este efecto debilita la unión del CO a la mioglobina. **(c)** Otra perspectiva (PDB ID 1MBO) muestra la disposición de los aminoácidos clave alrededor del hemo de la mioglobina. El O_2 unido forma un enlace de hidrógeno con la His distal, la His E7 (His^{64}), facilitando más aún la unión del O_2.

Una de las rutas principales viene proporcionada por la rotación de la cadena lateral de la His distal (His^{64}), que tiene lugar en una escala de nanosegundos (10^{-9} s). Incluso cambios conformacionales sutiles pueden ser claves para la actividad proteica.

El oxígeno es transportado en la sangre por la hemoglobina

Proteínas de unión a oxígeno—Hemoglobina: Transporte de oxígeno Prácticamente todo el oxígeno transportado por la sangre en los animales es unido y transportado por la hemoglobina de los eritrocitos (glóbulos rojos sanguíneos). Los eritrocitos humanos normales son discos bicóncavos pequeños (de 6 a 9 μm de diámetro). Se forman a partir de células madre precursoras llamadas **hemocitoblastos.** En el proceso de maduración, las células madre generan células hija que producen grandes cantidades de hemoglobina y a continuación pierden sus órganos intracelulares (núcleo, mitocondria y retículo endoplasmático). Los eritrocitos son por lo tanto células vestigiales incompletas, incapaces de reproducirse y, en los humanos, destinadas a sobrevivir durante tan sólo unos 120 días. Su principal función es

transportar hemoglobina la cual está disuelta en su citosol a una concentración muy alta (aproximadamente un 34% de su peso).

En la sangre arterial que pasa de los pulmones a través del corazón a los tejidos periféricos la hemoglobina está saturada con oxígeno en un 96%. En la sangre venosa que vuelve al corazón está saturada sólo en un 64%. Por lo tanto, cada 100 mL de sangre que pasa a través de los tejidos libera aproximadamente un tercio del oxígeno que transporta, o 6,5 mL de O_2 gaseoso a presión atmosférica y temperatura corporal.

La mioglobina, con su curva hiperbólica de unión al oxígeno (Fig. 5–4b), es relativamente insensible a pequeños cambios en la concentración del oxígeno disuelto y por lo tanto funciona bien como una proteína de almacenamiento de oxígeno. La hemoglobina, con sus múltiples subunidades y sitios de fijación de O_2, está mejor preparada para el transporte de oxígeno. Tal como veremos, las interacciones entre las subunidades de una proteína multimérica pueden permitir una respuesta altamente sensible a pequeños cambios en la concentración de ligando. Las interacciones entre las subunidades de la hemoglobina provocan cambios conformacionales que alteran la afinidad de la proteína por el oxígeno. La modulación de la unión del oxígeno permite a la proteína transportadora de O_2 responder a los cambios en la demanda de oxígeno por parte de los tejidos.

Las subunidades de la hemoglobina son estructuralmente similares a la mioglobina

La hemoglobina (M_r 64.500; abreviada como Hb) es más o menos esférica, con un diámetro de 5,5 nm. Es una proteína tetramérica que contiene cuatro grupos prostéticos hemo, cada uno asociado a una de las cadenas polipeptídicas. La hemoglobina de un adulto contiene dos tipos de globina, dos cadenas α (de 141 residuos cada una) y dos cadenas β (de 146 residuos cada una). A pesar de que menos de la mitad de los residuos de aminoácidos de las secuencias polipeptídicas de las subunidades α y β son idénticos, las estructuras tridimensionales de los dos tipos de subunidades son muy similares. Aún es más, sus estructuras son muy similares a la de la mioglobina **(Fig. 5–6)**, a pesar de que las secuencias de aminoácidos de los tres polipéptidos son idénticas en tan solo 27 posiciones **(Fig. 5–7)**. Los tres polipéptidos son miembros de la familia proteica de las globinas.

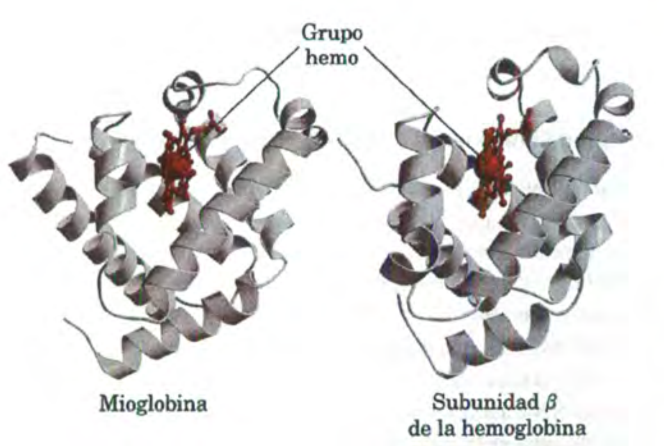


FIGURA 5–6 Comparación de las estructuras de la mioglobina (PDB ID 1MBO) y de la subunidad β de la hemoglobina (de PDB ID 1HGA).

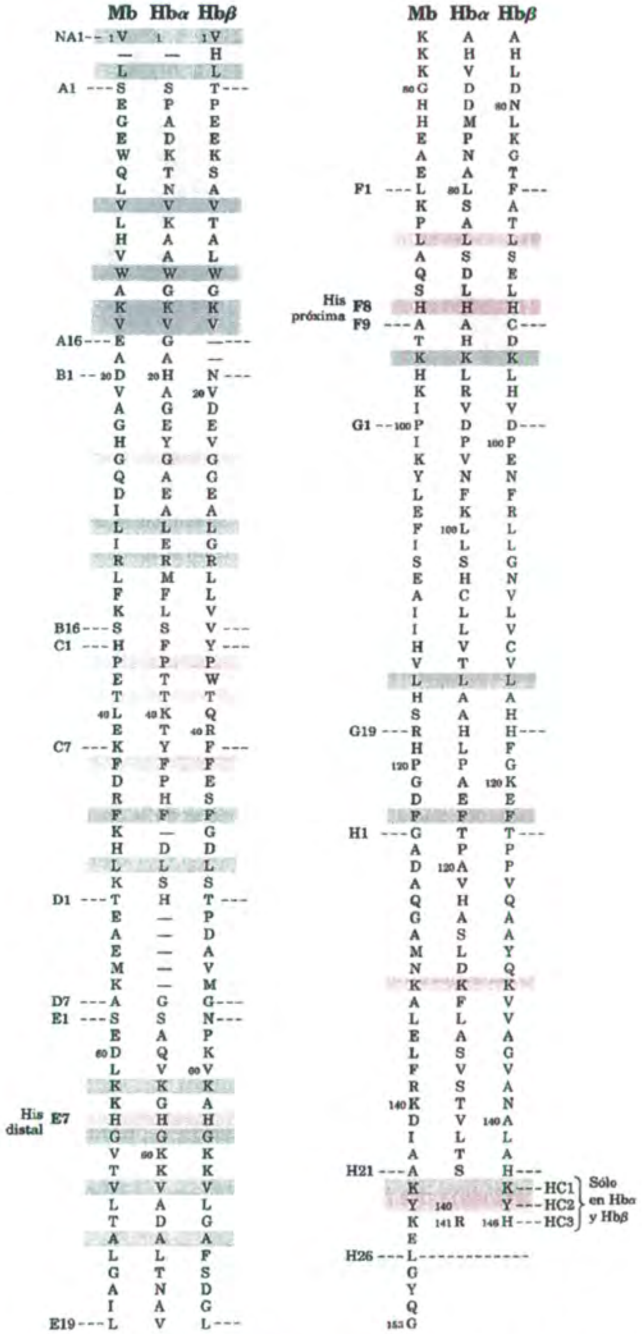


FIGURA 5–7 Secuencias de aminoácidos de la mioglobina de cachalote y de las cadenas α y β de la hemoglobina humana. Las líneas discontinuas señalan los límites entre hélices. Para alinear las secuencias de una manera óptima se han incluido algunos huecos en las dos secuencias de Hb en los lugares en donde hay un exceso de aminoácidos en las otras secuencias comparadas. Con la excepción de la hélice D, ausente en la Hbα, este alineamiento permite la designación por letras de las hélices que ayuda a destacar la posición común de los aminoácidos idénticos en las tres estructuras (sombreados en gris). Los residuos destacados en rosa están conservados en todas las globinas conocidas. Hay que tener en cuenta que una misma designación de letra y número, para aminoácidos presentes en dos o tres estructuras diferentes, no corresponde necesariamente con una posición común en la secuencia lineal de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, el residuo His distal es His E7 en las tres estructuras pero corresponde a la His[64], His[58] y a la His[63] en las secuencias lineales de la Mb, Hbα y Hbβ, respectivamente. Los residuos amino y carboxilo terminales que no pertenecen a hélices, situados más allá del primer (A) y último (H) de los segmentos hélice α, se designan como NA y HC respectivamente.

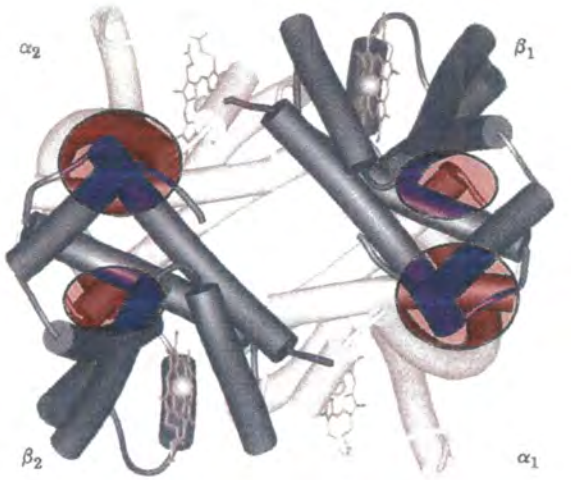


FIGURA 5–8 Interacciones dominantes entre las subunidades de hemoglobina. En esta representación, las subunidades α están en tono claro y las subunidades β en oscuro. Las interacciones más fuertes (destacadas) se producen entre subunidades no iguales. Cuando se une el oxígeno, el contacto $\alpha_1\beta_1$ cambia ligeramente; sin embargo, se produce un cambio sustancial en el contacto $\alpha_1\beta_2$, donde se rompen varios pares iónicos (PDB ID 1HGA).

La convención para nombrar las hélices descrita en el caso de la mioglobina es también aplicable para los polipéptidos de la hemoglobina, excepto que la subunidad α carece de la corta hélice D. La bolsa de unión del hemo está formado principalmente por las hélices E y F de cada una de las subunidades.

La estructura cuaternaria de la hemoglobina muestra fuertes interacciones entre subunidades diferentes. La interfase $\alpha_1\beta_1$ (y su equivalente $\alpha_2\beta_2$) implica más de 30 residuos y es suficientemente fuerte como para que, aunque un tratamiento suave con urea provoca una disociación del tetrámero en dímeros $\alpha\beta$, estos permanezcan intactos. La interfase $\alpha_1\beta_2$ (y la $\alpha_2\beta_1$) implica unos 19 residuos **(Fig. 5–8)**. Las interacciones hidrofóbicas predominan en todas las interfases, pero también hay muchos enlaces de hidrógeno y unos pocos pares iónicos (o puentes salinos) cuya importancia se discute más adelante.

La hemoglobina experimenta un cambio estructural al unirse al oxígeno

El análisis por rayos X ha revelado dos conformaciones principales de la hemoglobina: el **estado R** y el **estado T.** A pesar de que el oxígeno se une a la hemoglobina en cualquiera de estos dos estados tiene una afinidad considerablemente mayor por la hemoglobina en estado R. La unión del oxígeno estabiliza el estado R. Cuando el oxígeno está ausente experimentalmente, el estado T es más estable y es entonces la conformación predominante de la **desoxihemoglobina.** Los estados T y R fueron denominados originalmente como "tenso" y "relajado", debido a que el estado T está estabilizado por un mayor número de pares iónicos, muchos de los cuales pertenecen a la interfase $\alpha_1\beta_2$ (y a la $\alpha_2\beta_1$) **(Fig. 5–9)**. La unión del O_2 a una subunidad de hemoglobina en el estado T promueve un cambio conformacional hacia el estado R. Cuando toda la proteína sufre esta transición, las estructuras de las subunidades individuales cambian poco, pero los pares de subunidades $\alpha\beta$ se deslizan uno sobre otro y rotan, estrechando la bolsa entre las subunidades β

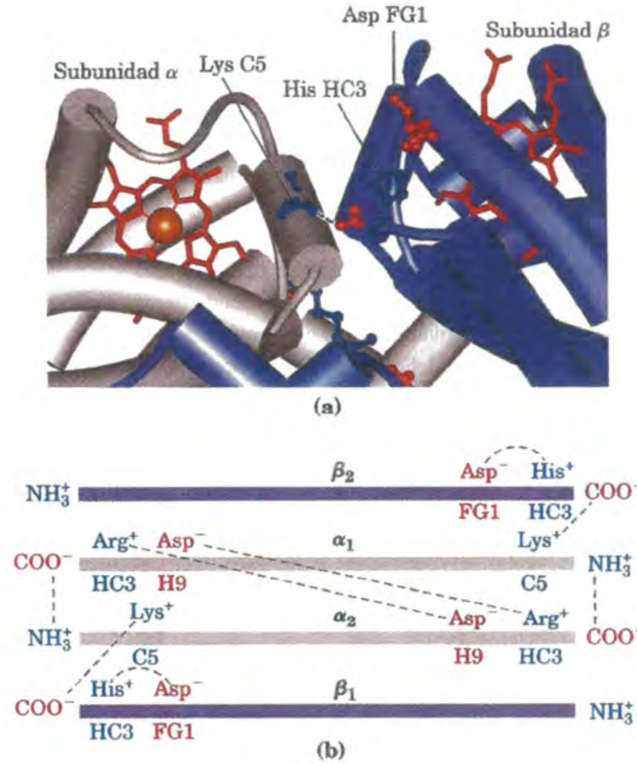


FIGURA 5–9 Algunos pares iónicos que estabilizan el estado T de la desoxihemoglobina (a) Visión en detalle de una porción de una molécula de desoxihemoglobina en estado T (PDB ID 1HGA). Las interacciones entre los pares iónicos His HC3 y Asp FG1 de la subunidad β (en azul) y entre la Lys C5 de la subunidad α (en gris) y el grupo α-carboxilo de la His C3 de la subunidad β se muestran con líneas discontinuas. (Recuérdese que el HC3 es el residuo carboxi-terminal de la subunidad β.) **(b)** Las interacciones entre estos pares iónicos y otros no mostrados en **(a)** se esquematizan en esta representación de las cadenas de polipéptido extendido de la hemoglobina.

(Fig. 5–10). En este proceso, algunos de los pares iónicos que estabilizan el estado T se rompen y se forman otros nuevos.

Max Perutz propuso que la transición T → R está provocada por cambios en las posiciones de cadenas laterales de aminoácidos clave que rodean al hemo. En el estado T, la porfirina está ligeramente curvada, provocando que el hierro hemo sobresalga ligeramente hacia la His próxima (His F8). La unión del O_2 provoca que el hemo adquiera una conformación más plana, cambiando la posición de la His próxima y de la hélice F unida **(Fig. 5–11)**. Estos cambios conducen a ajustes en los pares iónicos de la interfase $\alpha_1\beta_2$.

La hemoglobina une oxígeno de manera cooperativa

La hemoglobina debe unir oxígeno eficientemente en los pulmones, donde la pO_2 es aproximadamente de 13,3 kPa, y liberar oxígeno en los tejidos, donde la pO_2 es de unos 4 kPa. La mioglobina, como cualquier proteína que une oxígeno siguiendo una curva hiperbólica de unión, está poco preparada para esta función, por los motivos que se ilustran en la **Figura 5–12**. Una proteína que uniese O_2 con una alta afinidad lo uniría eficientemente en los pulmones pero no liberaría gran parte del mismo en los tejidos. Si la proteína uniese oxígeno con una afinidad suficientemente baja para liberarlo en los tejidos, no recogería demasiado oxígeno en los pulmones.

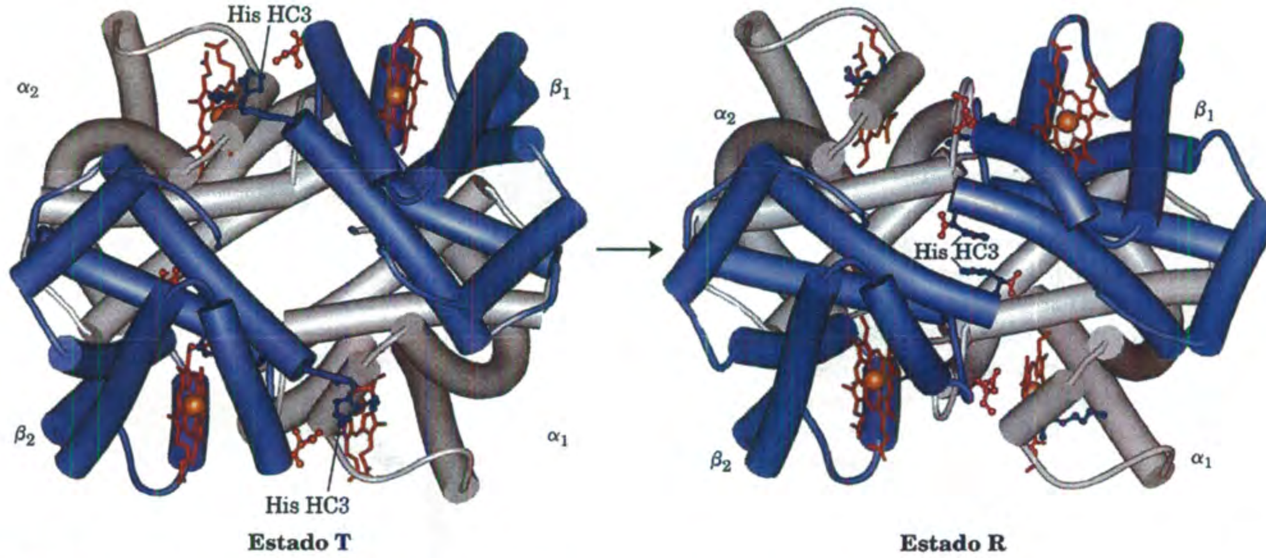


FIGURA 5–10 La transición T → R. (PDB ID 1HGA y 1BBB) En estas representaciones de la desoxihemoglobina, igual que en la Figura 5–9, las subunidades β se muestran en azul y las subunidades α en gris. Las cadenas laterales cargadas positivamente y los extremos de la cadena implicados en la formación de pares iónicos se muestran en azul y sus correspondientes parejas cargadas negativamente se muestran en rojo. La Lys C5 de cada subunidad α y el Asp FG1 de cada subunidad β son visibles aunque no están marcados (compárese con la Fig. 5–9a). Hay que destacar que la molécula tiene una orientación ligeramente diferente de la mostrada en la Figura 5–9. La transición del estado T al R desplaza de manera sustancial las parejas de subunidades, afectando a algunos de sus pares iónicos. Es destacable el caso de los residuos His HC3 del extremo carboxilo de las subunidades β, implicados en pares iónicos en el estado T, y que rotan hacia el centro de la molécula cuando se pasa al estado R, dejando de formar pares iónicos. Otra consecuencia destacable de la transición T → R es un estrechamiento de la bolsa entre las subunidades β.

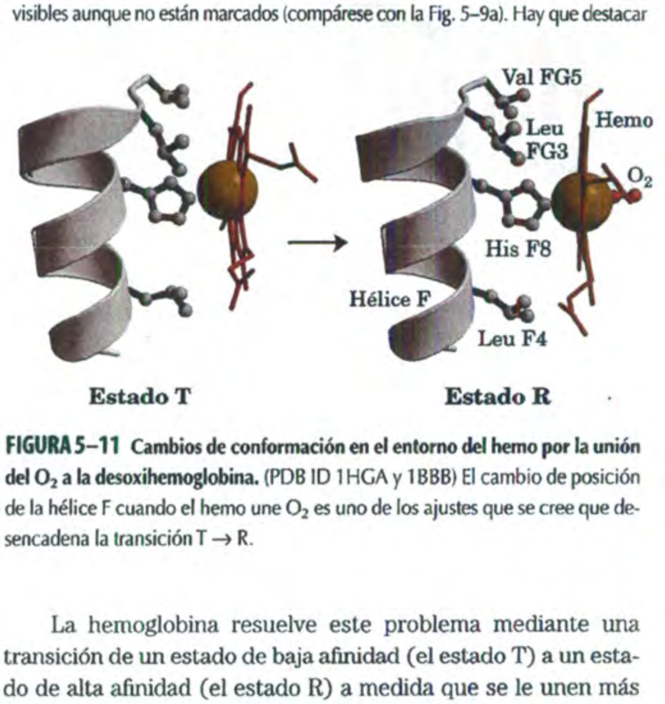


FIGURA 5–11 Cambios de conformación en el entorno del hemo por la unión del O_2 a la desoxihemoglobina. (PDB ID 1HGA y 1BBB) El cambio de posición de la hélice F cuando el hemo une O_2 es uno de los ajustes que se cree que desencadena la transición T → R.

La hemoglobina resuelve este problema mediante una transición de un estado de baja afinidad (el estado T) a un estado de alta afinidad (el estado R) a medida que se le unen más moléculas de O_2. Como resultado, la hemoglobina tiene una curva de unión a oxígeno híbrida, en forma de S o curva sigmoidea (Fig. 5–12). Una proteína de una sola subunidad con un único sitio de fijación de sustrato no puede tener una curva de unión sigmoidea (ni siquiera si la unión provocase un cambio conformacional) debido a que cada molécula de ligando se une independientemente y no podría afectar a la unión de otra molécula. Por el contrario, la unión del O_2 a las subunidades individuales de la hemoglobina puede alterar la afinidad para el O_2 de las subunidades adyacentes. La primera molécula de O_2 que interacciona con la desoxihemoglobina se une débilmente, debido a que se une a una subunidad en el estado T. Sin embargo, esta unión conduce a unos cambios conformacionales que se comunican a las subunidades adyacentes, haciendo más fácil la unión de moléculas de O_2 adicionales. En efecto, la transición T → R se produce más rápidamente en la segunda subunidad una vez que el O_2 se ha unido a la primera subunidad. La última molécula de O_2 (la cuarta) que se une al hemo lo hace a una subunidad

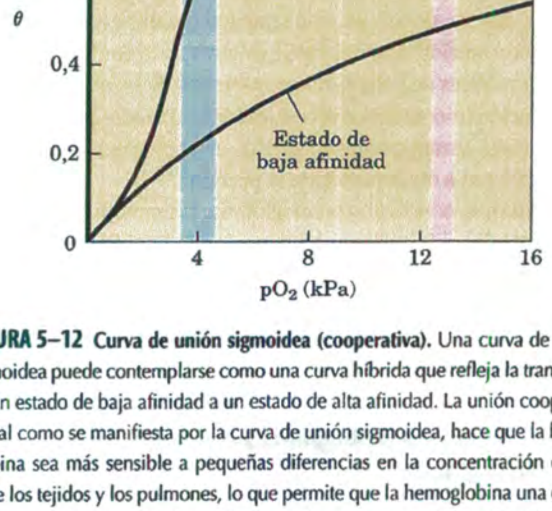


FIGURA 5–12 Curva de unión sigmoidea (cooperativa). Una curva de unión sigmoidea puede contemplarse como una curva híbrida que refleja la transición de un estado de baja afinidad a un estado de alta afinidad. La unión cooperativa, tal como se manifiesta por la curva de unión sigmoidea, hace que la hemoglobina sea más sensible a pequeñas diferencias en la concentración de O_2 entre los tejidos y los pulmones, lo que permite que la hemoglobina una oxígeno en los pulmones (donde la pO_2 es alta) y lo libere en los tejidos (donde la pO_2 es baja).

que ya está en el estado R y por tanto se une con una afinidad mucho mayor que la de la primera molécula.

Una **proteína alostérica** es aquella en la cual la unión de un ligando afecta a las propiedades de unión de otro sitio de la misma proteína. El término "alostérico proviene del griego *allos*, "otro", y *stereos*, "sólido" o "forma". Las proteínas alostéricas son aquellas que tienen "otras formas" o conformaciones inducidas por la unión de ligandos conocidos como moduladores. Los cambios conformacionales inducidos por el/los modulador(es) interconvierten formas más activas y menos activas de la proteína. Los moduladores de las proteínas alostéricas pueden ser tanto inhibidores como activadores. Cuando el ligando normal y el modulador son idénticos la interacción se denomina **homotrópica.** Cuando el modulador es una molécula diferente del ligando normal la interacción es **heterotrópica.** Algunas proteínas tienen dos o más moduladores y por lo tanto pueden tener interacciones homotrópicas y heterotrópicas.

La unión cooperativa de un ligando a una proteína multimérica, tal como la que se produce con la unión del O_2 a la hemoglobina, es una forma de unión alostérica. La unión de un ligando afecta a las afinidades de cualquiera de los restantes sitios de fijación no ocupados, y el O_2 puede ser considerado tanto un ligando normal como un modulador homotrópico activador. Hay sólo un sitio de fijación para el O_2 en cada subunidad, de modo que los efectos alostéricos que dan lugar a la cooperatividad están mediados por cambios conformacionales transmitidos de una subunidad a otra por interacciones subunidad-subunidad. Una curva de unión sigmoidea es diagnóstico de una unión cooperativa. Permite una respuesta mucho más sensible a las concentraciones de ligando y es importante para la función de muchas proteínas multiméricas. El principio del efecto alostérico puede extenderse fácilmente al caso de los enzimas reguladores, tal como veremos en el Capítulo 6.

Los cambios conformacionales cooperativos dependen de variaciones en la estabilidad estructural de partes diferentes de la proteína, como se vio en el Capítulo 4. Los sitios de fijación de una proteína alostérica suelen consistir en segmentos estables próximos a segmentos relativamente inestables, siendo éstos últimos capaces de sufrir cambios frecuentes en su conformación o de llevar a cabo movimientos desorganizados **(Fig. 5–13)**. Cuando se produce la unión de un ligando, las partes móviles del sitio de fijación de una proteína pueden quedar estabilizadas en una conformación determinada que afecta a la conformación de las subunidades de polipéptido adyacentes. Si la totalidad del sitio de fijación tuviera una gran estabilidad, al unirse en él un ligando tan sólo serían posibles cambios estructurales limitados que se propagan a otras partes de la proteína.

Al igual que ocurre con la mioglobina, la hemoglobina puede unir ligandos diferentes al oxígeno. Un ejemplo importante es el monóxido de carbono, que se une a la hemoglobina con una eficiencia unas 250 veces superior a la del oxígeno. La exposición de humanos al CO puede tener consecuencias trágicas (Recuadro 5–1).

La unión cooperativa de ligando puede ser descrita cuantitativamente

La unión cooperativa del oxígeno por la hemoglobina fue analizada por primera vez por Archibald Hill en el año 1910. A partir de sus descubrimientos se enunció un método general para el estudio de la unión cooperativa de ligandos a proteínas multisubunitarias.

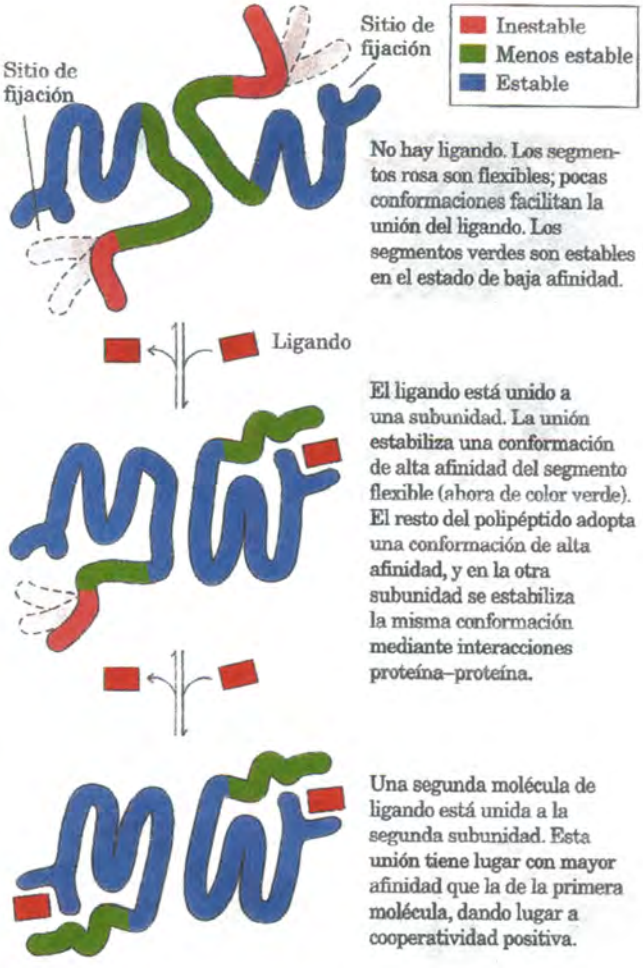


FIGURA 5–13 Cambios estructurales en una proteína con varias subunidades que se une cooperativamente a un ligando. La estabilidad estructural no es uniforme en una molécula de proteína. Aquí se muestra una proteína dimérica hipotética formada por regiones de estabilidad alta (azul), media (verde) y baja (rojo). Los sitios de fijación de ligando están compuestos de segmentos de alta y baja estabilidad, por lo que la afinidad por el ligando es relativamente baja. Los cambios conformacionales producidos al unirse el ligando hacen que la proteína pase desde un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad, una forma de encaje inducido.

Para una proteína con n sitios de fijación el equilibrio de la ecuación 5–1 se convierte en

$$P + nL \rightleftharpoons PL_n \qquad (5\text{–}12)$$

y entonces la expresión para la constante de asociación pasa a ser

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n} \qquad (5\text{–}13)$$

La ecuación para θ (vea la ecuación 5–8) es

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} \qquad (5\text{–}14)$$

RECUADRO 5-1 MEDICINA Monóxido de carbono: un asesino silencioso

Lake Powell, Arizona, en agosto de 2000. Una familia se encontraba de vacaciones en una casa flotante arrendada. Pusieron en marcha el generador de electricidad para poder conectar un aparato de aire acondicionado y un televisor. Aproximadamente 15 minutos después, dos hermanos de 8 y 11 años saltaron desde la cubierta de popa. Justo debajo de la cubierta estaba situado el tubo de escape del generador. En el lapso de dos minutos, los dos hermanos quedaron rendidos a causa de la inhalación del monóxido de carbono del tubo de escape, que había quedado concentrado debajo de la cubierta. Ambos se ahogaron. Estas muertes, junto con otras más que ocurrieron en la década de 1990 y que estaban relacionadas con casas flotantes de diseño similar, hicieron que se reconsiderara y rediseñara el montaje de los tubos de escape de los generadores.

El monóxido de carbono (CO), un gas incoloro e inodoro, causa más de la mitad de las muertes por envenenamiento en el mundo. El CO tiene una afinidad por la hemoglobina unas 250 veces mayor que la del oxígeno. Por ello, niveles relativamente bajos de CO pueden tener importantes y trágicos efectos. Cuando el CO se combina con la hemoglobina, el complejo resultante se denomina carboxihemoglobina o COHb.

Algunos procesos naturales generan cierta cantidad de CO, pero los niveles elevados localizados suelen ser el resultado de la actividad humana. Los tubos de escape de motores y estufas constituyen fuentes importantes de CO, al ser éste un producto secundario de la combustión incompleta de combustibles fósiles. Tan sólo en Estados Unidos, casi 4.000 personas mueren cada año a causa de envenenamiento por CO, ya sea accidental o intencionadamente. Muchas de las muertes accidentales se producen por un aumento no detectado de CO en espacios cerrados, como el que se produce cuando una estufa doméstica no funciona bien o tiene pérdidas e insufla CO dentro de la casa. Sin embargo, también es posible la intoxicación por CO en espacios abiertos, en los que personas desprevenidas pueden inhalar los gases de escape de generadores, motores fuera borda, motores de tractor o cortadoras de césped.

Es poco frecuente que los niveles de monóxido de carbono en la atmósfera sean peligrosos, ya que oscilan entre menos de 0,05 partes por millón (ppm) en áreas remotas e inhabitadas y 3 a 4 ppm en algunas ciudades del hemisferio norte. En Estados Unidos el límite impuesto por el gobierno (por la Ocupational Safety and Health Administration, OSHA) en lugares de trabajo es de 50 ppm para personas que trabajen en turnos de ocho horas. La fuerte unión del CO a la hemoglobina implica que la COHb se puede acumular a lo largo del tiempo si las personas se exponen a un bajo nivel pero constante de CO.

En un individuo sano, el 1% o menos de la hemoglobina total forma complejo en forma de COHb. Al ser el CO un producto del humo del tabaco, muchos fumadores tienen niveles de COHb en un intervalo del 3% al 8% de su hemoglobina total, pudiendo aumentar hasta el 15% en fumadores compulsivos. Los niveles de COHb se equilibran al 50% en las personas que aspiran aire que contiene 570 ppm de CO durante varias horas. Se han desarrollado métodos para relacionar el contenido de CO en la atmósfera con los niveles de COHb en sangre (Fig. 1). En pruebas efectuadas con generadores de casas flotantes como el responsable de las muertes de Lake Powell, los niveles de CO subieron hasta 6.000 o 30.000 ppm bajo cubierta, y los niveles de O_2 atmosférico bajaron desde un 21% a un 12%. Incluso por encima de la cubierta se detectaron niveles de CO de 7.200 ppm, suficientes para provocar la muerte en pocos minutos.

¿De qué manera afecta al organismo humano la COHb? Raramente se observan síntomas a niveles de menos del 10% de la hemoglobina total. Al 15% se empieza a experimentar ligeros dolores de cabeza. Entre el 20% y el 30%, el dolor de cabeza es muy agudo y está acompañado de náuseas, vértigo, confusión, desorientación y algunas molestias visuales; estos síntomas suelen desaparecer si se trata al individuo con oxígeno. A niveles de COHb del 30% al 50%, los síntomas neurológicos se hacen más graves y a niveles superiores al 50% se pierde la conciencia hasta caer en coma. Seguidamente puede producirse una parada respiratoria. Si la exposición ha sido prolongada pueden producirse daños permanentes. Niveles superiores al 60% son mortales. La autopsia de los niños que murieron en Lake Powell reveló que sus niveles de COHb eran del 59% y del 52%.

La unión de CO a la hemoglobina está afectada por muchos factores, entre los que se incluye el ejercicio (Fig. 1) y los cambios en la presión del aire relacionados con la altitud. Al tener los fumadores niveles basales más elevados de COHb, los que se exponen a una fuente de CO suelen presentar síntomas más rápidamente que los no fumadores. Las personas afectadas de enfermedades cardíacas, pulmonares o sanguíneas que reducen la disponibilidad del oxígeno a los tejidos también experimentan los síntomas a niveles más bajos de exposición. Los fetos corren un riesgo elevado de envenenamiento por CO porque la hemoglobina fetal tiene una afinidad ligeramente más elevada por el CO que la adulta. Se han registrado casos en los que el feto ha muerto pero la madre ha sobrevivido.

(*continúa en la página siguiente*)

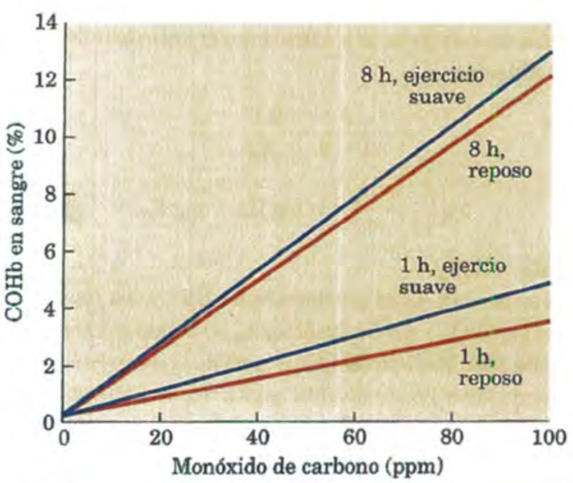


FIGURA 1 Relación entre los niveles de COHb en sangre y la concentración de CO en el aire circundante. Se muestran cuatro condiciones de exposición diferentes, comparando los efectos de una exposición corta con otra más prolongada y una exposición en reposo con una exposición durante el ejercicio.

(continuación de la página anterior)

Puede parecer chocante que la pérdida de la mitad de la hemoglobina en forma de COHb resulte fatal, puesto que sabemos que personas con diversos tipos de anemia suelen vivir razonablemente bien con la mitad de la cantidad total de hemoglobina. Sin embargo, la unión de CO a la hemoglobina tiene efectos más allá del de eliminar parte de proteína del total disponible para la unión del oxígeno. También afecta a la afinidad del resto de subunidades de la hemoglobina para con el oxígeno. Al unirse CO a una o dos subunidades de un tetrámero de hemoglobina, la afinidad hacia el O_2 se incrementa sustancialmente en las restantes subunidades (Fig. 2). De este modo, un tetrámero de hemoglobina con dos moléculas de CO unidas puede fijar O_2 de modo eficiente en los pulmones pero liberarlo con poca eficiencia en los tejidos. Con ello, los tejidos sufren pronto una privación de oxígeno. El problema se acentúa porque los efectos del CO no se limitan a su interferencia con la función de la hemoglobina. El CO se une a otras proteínas con grupos hemo y a una variedad de metaloproteínas. Todavía no se conocen bien los efectos de estas interacciones, pero pueden ser responsables de algunos de los efectos a largo plazo del envenenamiento agudo y no mortal por CO.

Cuando se sospecha un envenenamiento por CO, resulta esencial una rápida evacuación de la persona afectada de la fuente de CO, aunque esto no garantiza una recuperación rápida. Cuando se produce el traslado desde un lugar contaminado con CO a una atmósfera exterior normal, el O_2 empieza a sustituir el CO de la hemoglobina. Sin embargo, los niveles de COHb descienden bastante lentamente; el tiempo medio es de 2 a 6,5 horas, en función del individuo y de factores ambientales. Si se administra oxígeno al 100% a través de una máscara, la velocidad de recambio puede aumentar hasta cuatro veces; el tiempo medio del intercambio O_2–CO puede reducirse a decenas de minutos si se administra oxígeno al 100% a una presión de 3 atm (303 kPa). De este modo, resulta crítico el tratamiento a cargo de un equipo médico competente y bien equipado.

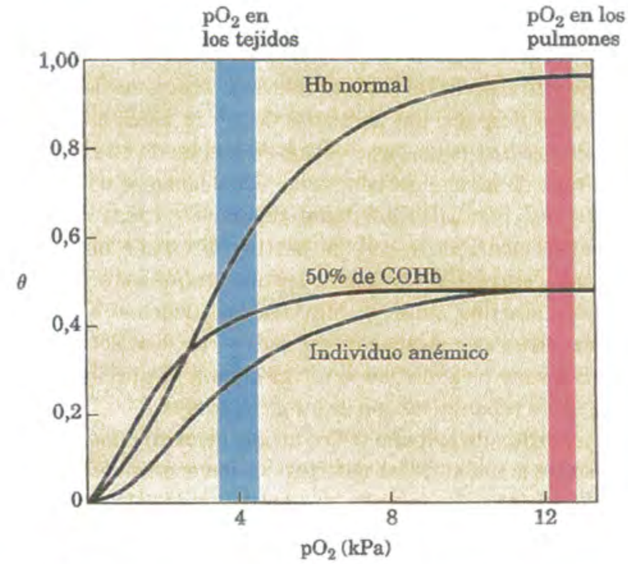


FIGURA 2 Diversas curvas de unión a oxígeno: de hemoglobina normal, hemoglobina de un individuo anémico con el 50% de su hemoglobina funcional y hemoglobina de un individuo con el 50% de sus subunidades de hemoglobina acomplejadas con CO. Se indica la pO_2 en pulmones y tejidos humanos.

Está altamente recomendada la instalación de detectores de monóxido de carbono en las casas. Se trata de una medida simple y barata que puede evitar una posible tragedia. Al terminar de recopilar los datos para este recuadro, adquirimos inmediatamente detectores de CO nuevos para nuestras casas.

Reordenando los términos y calculando el logaritmo de ambos lados obtenemos

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{[L]^n}{K_d} \qquad (5\text{–}15)$$

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log [L] - \log K_d \qquad (5\text{–}16)$$

donde $K_d = [L]^n_{0,5}$.

La ecuación 5–16 es la **ecuación de Hill,** y una representación del log $[\theta/(1-\theta)]$ frente al log[L] se denomina **representación de Hill.** Basándose en la ecuación, la representación de Hill debería tener una pendiente igual a n. Sin embargo, la pendiente determinada experimentalmente no refleja el número de sitios de fijación sino el grado de interacción entre ellos. La pendiente para una curva de Hill se indica por tanto como n_H, el **coeficiente de Hill,** que es una medida del grado de cooperatividad. Si n_H es igual a 1, la unión al ligando no es cooperativa, una situación que puede producirse incluso en una proteína multimérica si las subunidades no se comunican. Un n_H mayor que 1 indica que hay una cooperatividad positiva en la unión del ligando. Ésta es la situación que se observa en la hemoglobina, en la que la unión de una molécula de ligando facilita la unión de las otras. El límite superior teórico para n_H se alcanza cuando $n_H = n$. En este caso la unión sería completamente cooperativa: todos los sitios de fijación en una proteína unirían el ligando simultáneamente, y no habría moléculas de proteína parcialmente saturadas de ligando en ningún caso. Este límite nunca se alcanza en la práctica, y el valor medido de n_H es siempre menor que el número de sitios de fijación de ligando de la proteína.

Un n_H menor que 1 indica cooperatividad negativa, la unión de una molécula de ligando *dificulta* la unión de otras. Hay pocos casos bien documentados de cooperatividad negativa.

Para adaptar la ecuación de Hill a la unión de oxígeno por parte de la hemoglobina debemos sustituir de nuevo [L] por pO_2 y K_d por P_{50}^n:

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log pO_2 - n \log P_{50} \qquad (5\text{–}17)$$

Las representaciones de Hill para la mioglobina y la hemoglobina se presentan en la **Figura 5–14**.

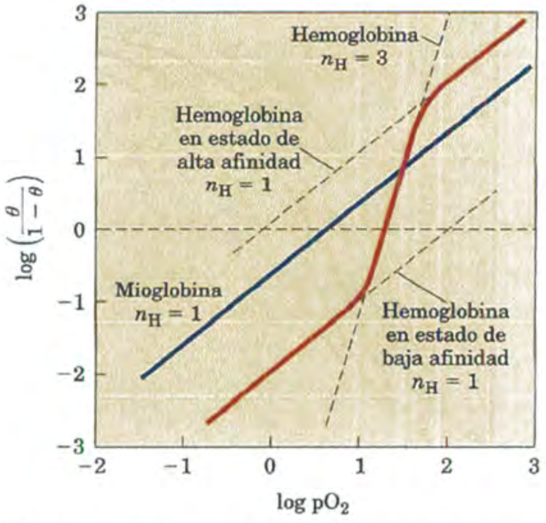


FIGURA 5–14 Gráficas de Hill para la unión del oxígeno a la mioglobina y a la hemoglobona. Cuando $n_H = 1$ no existe cooperatividad evidente. El máximo grado de cooperatividad observado para la hemoglobina corresponde aproximadamente a $n_H = 3$. Obsérvese que, mientras esto indica un alto nivel de cooperatividad, n_H es menor que n, siendo n el número de sitios de fijación de O_2 de la hemoglobina. Esto es lo normal para una proteína que presenta unión alostérica.

Existen dos modelos que explican los mecanismos de la unión cooperativa

Los bioquímicos tienen hoy una gran cantidad de información sobre los estados T y R de la hemoglobina, pero queda mucho por aprender sobre cómo se produce la transición T → R. Existen dos modelos para la unión cooperativa de ligandos a las proteínas con múltiples sitios de fijación que han influenciado en gran medida las ideas que se tienen sobre este problema.

El primer modelo fue el propuesto por Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux en 1965, es el llamado **modelo MWC** o **modelo concertado (Fig. 5–15a)**. En el modelo concertado se considera que las subunidades de una proteína con unión cooperativa son funcionalmente idénticas, que cada subunidad puede existir en (como mínimo) dos conformaciones, y que todas las subunidades sufren la transición de una conformación a otra de manera simultánea. En este modelo ninguna proteína tiene subunidades con conformaciones diferentes. Las dos conformaciones están en equilibrio. El ligando puede unirse a cualquiera de ellas aunque con diferente afinidad. La unión sucesiva de moléculas de ligando a la conformación de baja afinidad (la cual sería más estable en ausencia de ligando) hace más probable la transición a la conformación de alta afinidad.

En el segundo modelo, el **modelo secuencial** (Fig. 5–15b) propuesto en 1966 por Daniel Koshland y colaboradores, la unión del ligando puede inducir un cambio de conformación en una subunidad individual. Un cambio de conformación en una subunidad provoca un cambio similar en la subunidad adyacente, así como hace más probable la unión de una segunda molécula de ligando. Hay más estados intermedios potenciales en este modelo que en el modelo concertado. Los dos modelos no son mutuamente excluyentes: el modelo concertado puede verse como un caso límite de "todo o nada" del modelo secuencial. En el Capítulo 6 utilizaremos estos modelos para la discusión sobre los enzimas alostéricos.

La hemoglobina también transporta H^+ y CO_2

Además de transportar prácticamente todo el oxígeno necesario para las células de los pulmones a los tejidos, la hemoglobina transporta dos productos finales de la respiración celular (H^+ y CO_2) de los tejidos a los pulmones y los riñones, donde son excretados. El CO_2 producido por la oxidación de combustibles orgánicos en la mitocondria, se hidrata para formar bicarbonato:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Esta reacción está catalizada por la **carbónico anhidrasa,** un enzima especialmente abundante en los eritrocitos. El dióxido de carbono no es demasiado soluble en solución acuosa, y, de no ser convertido en bicarbonato, se formarían burbujas de CO_2 en los tejidos y en la sangre. Tal como puede verse en la reacción catalizada por la carbónico anhidrasa, la hidratación del CO_2

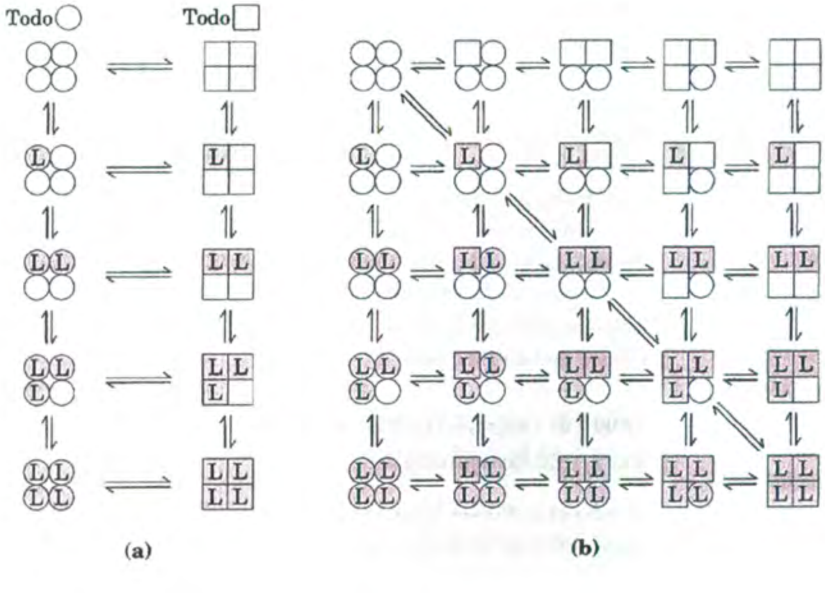


FIGURA 5–15 Dos modelos generales para la interconversión de las formas inactiva y activa de proteínas durante la unión cooperativa a ligando. A pesar de que los modelos pueden aplicarse a cualquier proteína (incluyendo cualquier enzima, Capítulo 6) que presente unión cooperativa, se muestran cuatro subunidades debido a que el modelo fue propuesto originalmente para la hemoglobina. **(a)** En el modelo concertado o de todo o nada (modelo MWC) se postula que todas las subunidades están en la misma conformación, ya sea como ○ (baja afinidad o inactiva) o como □ (alta afinidad o activa). Dependiendo del equilibrio, K_1, entre las formas ○ y □, la unión de una o más moléculas de ligando (L) desplazará el equilibrio hacia la forma □. Las sub-unidades con un L unido están sombreadas. **(b)** En el modelo secuencial cada subunidad individual puede estar en la forma ○ o en la forma □ , siendo posible un gran número de conformaciones.

provoca un aumento de la concentración de H^+ (un descenso del pH) en los tejidos. La unión de oxígeno a la hemoglobina se ve muy afectada por el pH y la concentración de CO_2, por lo que la interconversión de CO_2 y bicarbonato es de gran importancia para la regulación de la unión de oxígeno y su liberación en la sangre.

La hemoglobina transporta alrededor del 40% del total de H^+ y del 15% al 20% del CO_2 formado en los tejidos hacia los pulmones y los riñones. (El resto de H^+ es absorbido por el tampón bicarbonato del plasma; el resto del CO_2 se transporta en forma de HCO_3^- y CO_2 disueltos.) La unión del H^+ y CO_2 está inversamente relacionada con la unión de oxígeno. Con un pH relativamente bajo y altas concentraciones de CO_2 en los tejidos periféricos, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno disminuye a medida que se unen H^+ y CO_2, y se libera oxígeno a los tejidos. Por el contrario, a medida que se excreta CO_2 en los capilares pulmonares y aumenta consecuentemente el pH de la sangre, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno aumenta y la proteína une más O_2 para su transporte a los tejidos periféricos. Este efecto del pH y de la concentración de CO_2 sobre la unión y liberación de oxígeno por la hemoglobina es el llamado **efecto Bohr,** en honor de Christian Bohr, el fisiólogo danés (y padre del físico Niels Bohr) que lo descubrió en 1904.

El equilibrio de unión de la hemoglobina y una molécula de oxígeno puede describirse por la reacción

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$

que no es una expresión completa. Para tener en cuenta el efecto de la concentración de H^+ sobre este equilibrio de unión, debemos reescribir la reacción como

$$HHb^+ + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + H^+$$

donde HHb^+ designa una forma protonada de la hemoglobina. Esta ecuación nos dice que la curva de saturación de O_2 de la hemoglobina está influenciada por la concentración de H^+ **(Fig. 5–16)**. Tanto el O_2 como el H^+ se unen a la hemoglobina, aunque con afinidades inversas. Cuando la concentración de oxígeno es alta, como ocurre en los pulmones, la hemoglobina une O_2 y libera protones. Cuando la concentración de oxígeno es baja, situación que se da en los tejidos periféricos, se une H^+ y se libera O_2.

El oxígeno y el H^+ no se unen a los mismos sitios de la hemoglobina. El oxígeno se une a los átomos de hierro de los hemo, mientras que el H^+ se puede unir a diversos residuos de aminoácido de la proteína. La His^{146} (His HC3) de las subunidades β realiza un aporte fundamental al efecto Bohr. Este residuo forma, al protonarse, uno de los pares iónicos (con el Asp^{94}, Asp FG1) que ayudan a estabilizar la desoxihemoglobina en el estado T (Fig. 5–9). El par iónico estabiliza la forma protonada de la His HC3, dándole a este residuo un pK_a anormalmente alto en el estado T. El pK_a cae a su valor normal de 6,0 en el estado R debido a que el par iónico no puede formarse, y este residuo está en su mayor parte desprotonado en la oxihemoglobina a pH 7,6, el pH de la sangre en los pulmones. A medida que aumenta la concentración de H^+, se produce la protonación de la His HC3, lo que favorece la transición al estado T provocando la liberación de oxígeno. Un efecto similar se produce con la protonación de los residuos amino terminales de las subunidades α, de otros residuos His y quizás de otros grupos.

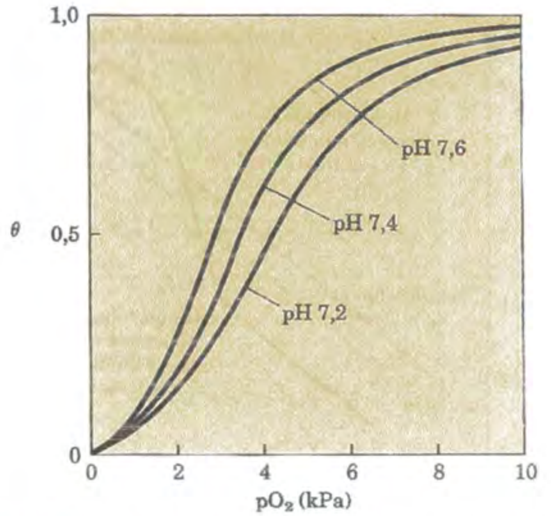
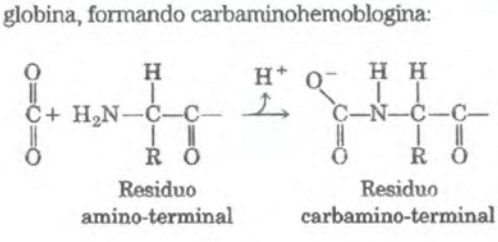


FIGURA 5–16 Efecto del pH sobre la unión de oxígeno por la hemoglobina. El pH de la sangre en los pulmones es 7,6 y en los tejidos 7,2. Las medidas experimentales sobre la unión de oxígeno por la hemoglobina se suelen tomar a pH 7,4.

Así vemos que las cuatro cadenas polipeptídicas de la hemoglobina se comunican unas con otras no sólo por la unión de O_2 a sus grupos hemo sino también por la unión de H^+ a residuos aminoácidos específicos. Y aún hay otros elementos que añadir al entramado. La hemoglobina también une CO_2, y de modo también inversamente proporcional a la unión de oxígeno. El dióxido de carbono se une en forma de grupo carbamato al grupo α-amino del extremo amino terminal de cada cadena de globina, formando carbaminohemoblogina:



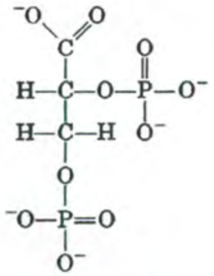
Esta reacción produce H^+ y contribuye al efecto Bohr. Los carbamatos unidos también forman puentes salinos adicionales (no mostrados en la Figura 5–9) que ayudan a estabilizar el estado T y favorecen la liberación de oxígeno.

Cuando la concentración de dióxido de carbono es alta, tal como ocurre en los tejidos periféricos, se une algo de CO_2 a la hemoglobina y la afinidad por el O_2 disminuye, haciendo que éste se libere. A su vez, cuando la hemoglobina llega a los pulmones, la alta concentración de oxígeno favorece la unión de O_2 y la liberación de CO_2. Es la capacidad de comunicar información de unión a ligando de una subunidad polipeptídica a las otras lo que convierte a la hemoglobina en una molécula tan perfectamente adaptada a la integración del transporte de O_2, CO_2 y H^+ por parte de los eritrocitos.

La unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada por el 2,3-bisfosfoglicerato

La interacción del **2,3-bisfosfoglicerato (BPG)** con las moléculas de hemoglobina perfecciona aún más la función de la he-

moglobina y proporciona un ejemplo de modulación alostérica heterotrópica.



2,3-Bisfosfoglicerato

El BPG está presente en concentraciones relativamente altas en los eritrocitos. Cuando se aísla la hemoglobina contiene una cantidad significativa de BPG unido, cuya eliminación completa resulta difícil. De hecho, las curvas de unión a O_2 para la hemoglobina que hemos examinado hasta ahora se habían obtenido en presencia de BPG unido. Se sabe que el 2,3-bisfosfoglicerato reduce de manera considerable la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, hay una relación inversa entre la unión de O_2 y la unión de BPG. Por tanto podemos describir otro proceso de unión para la hemoglobina:

$$\text{HbBPG} + O_2 \rightleftharpoons \text{HbO}_2 + \text{BPG}$$

El BPG se une a un sitio alejado del sitio de fijación para el O_2 y regula la afinidad de unión de la hemoglobina para el O_2 en relación a la pO_2 en los pulmones. El BPG juega un papel importante en las adaptaciones fisiológicas a la menor pO_2 disponible a grandes alturas. Para un humano sano que se pasee a nivel del mar, la unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada de manera que la cantidad de O_2 liberada a los tejidos equivale aproximadamente al 40 % del máximo que podría ser transportado por la sangre **(Fig. 5–17)**. Imaginemos que la misma persona se traslada rápidamente a un lugar montañoso a 4.500 m de altitud, en donde la pO_2 es considerablemente menor. La liberación de O_2 a los tejidos se ve ahora reducida. Sin embargo, después de unas pocas horas de permanencia a gran altitud, la concentración de BPG de la sangre empieza a aumentar, conduciendo a una disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Este ajuste del nivel de BPG tiene un efecto pequeño sobre la unión de O_2 en los pulmones pero afecta de manera importante a la liberación de O_2 en los tejidos. Por ello, la liberación de oxígeno en los tejidos vuelve a ser de casi el 40 % del que puede ser transportado por la sangre. La situación se invierte cuando la persona vuelve al nivel del mar. La concentración de BPG en los eritrocitos también aumenta en las personas que sufren **hipoxia,** una disminución en la oxigenación en los tejidos periféricos debida a un mal funcionamiento de los pulmones o del sistema circulatorio.

El BPG se une a la hemoglobina en la cavidad existente entre las subunidades β en el estado T **(Fig. 5–18)**. Esta cavidad está recubierta por residuos aminoácidos cargados positivamente que interaccionan con los grupos cargados negativamente del BPG. A diferencia del O_2, sólo se une una molécula de BPG a cada tetrámero de hemoglobina. El BPG disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno al estabilizar el estado T. La transición al estado R provoca un estrechamiento de la bolsa

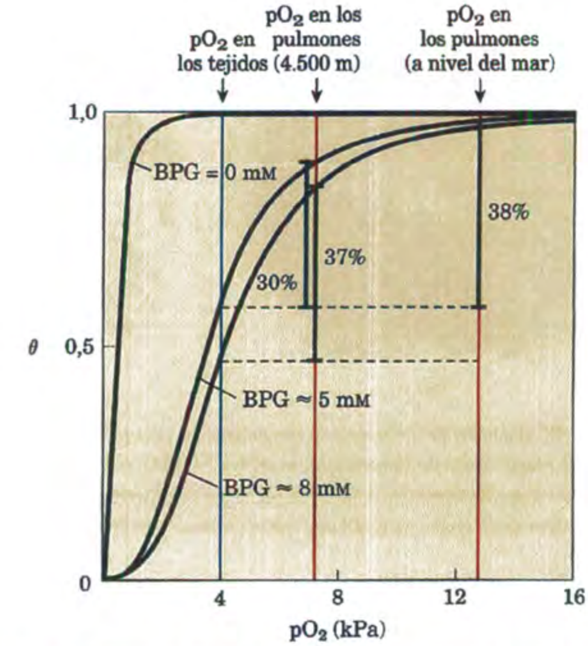


FIGURA 5–17 Efecto del BPG sobre la unión de oxígeno a la hemoglogina. La concentración de BPG en la sangre humana normal es aproximadamente 5 mM cuando se está a nivel del mar y alrededor de 8 mM a grandes altitudes. Observe que la hemoglobina une oxígeno muy fuertemente en ausencia de BPG, presentando entonces una curva de unión hiperbólica. En realidad, el coeficiente de Hill observado para la unión cooperativa de O_2 disminuye sólo ligeramente (de 3 a 2,5) cuando se extrae el BPG de la hemoglobina, pero la parte creciente de la curva sigmoidea está confinada a una región muy pequeña cercana al origen. A nivel del mar, la hemoglobina está prácticamente saturada con O_2 en los pulmones, pero su nivel de saturación es sólo de un 60% en los tejidos, de manera que la cantidad de oxígeno liberado en los tejidos es cercana al 38% del máximo que puede ser transportado por la sangre. A grandes altitudes la liberación de O_2 disminuye aproximadamente una cuarta parte, alcanzando como máximo el 30%. Sin embargo, un aumento en la concentración de BPG disminuye la afinidad de la hemoglobina por el O_2 haciendo que de nuevo se libere a los tejidos cerca de un 37% del oxígeno transportado.

de unión a BPG, impidiendo la unión del BPG. En ausencia de BPG, la hemoglobina pasa más fácilmente al estado R.

La regulación de la unión de oxígeno a la hemoglobina por el BPG juega un papel importante en el desarrollo fetal. La hemoglobina fetal debe tener una mayor afinidad por el O_2 que la hemoglobina materna debido a que el feto debe extraer el oxígeno de la sangre de su madre. El feto sintetiza subunidades γ en lugar de las β, formándose la hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$. Este tetrámero tiene una afinidad por el BPG mucho menor que la de la hemoglobina adulta normal, y por lo tanto una mayor afinidad por el oxígeno. **Proteínas de unión a oxígeno – La hemoglobina puede estar regulada alostéricamente**

La anemia falciforme es una enfermedad molecular de la hemoglobina

La enfermedad humana hereditaria llamada anemia falciforme demuestra de manera indiscutible la gran importancia de la secuencia de aminoácidos para determinar las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas globulares y por lo tanto sus funciones biológicas. Se conocen

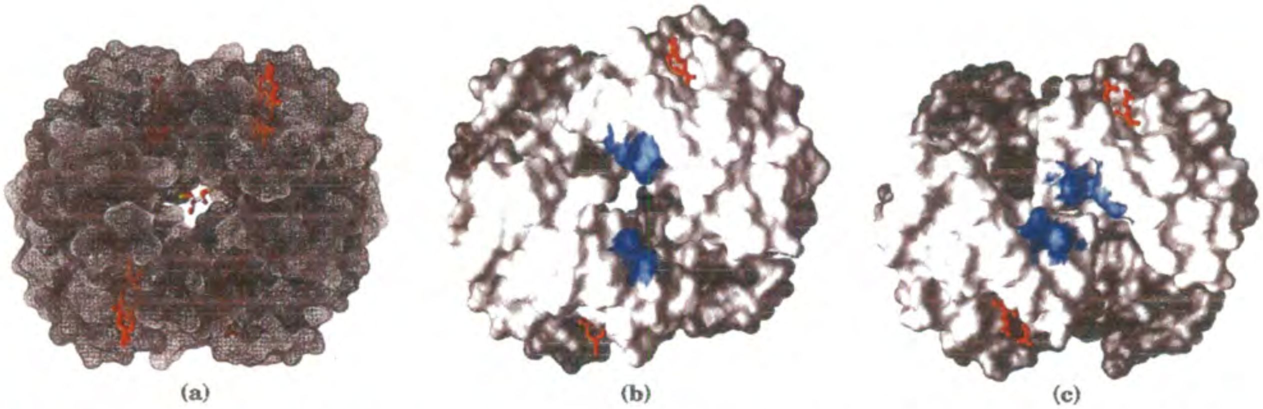


FIGURA 5–18 Unión del BPG a la desoxihemoglobina. **(a)** La unión del BPG estabiliza el estado T de la desoxihemoglobina (PDB ID 1HGA), representada aquí por una imagen de superficie de malla. **(b)** Las cargas negativas del BPG interaccionan con varios grupos cargados positivamente (mostrados en azul) que rodean a la bolsa entre las subunidades β en el estado T. **(c)** La bolsa de unión para el BPG desaparece con la oxigenación, produciéndose la transición al estado R (PDB ID 1BBB). (Compare **(b)** y **(c)** con la Fig. 5–10.)

más de 500 variantes genéticas de la hemoglobina en la población humana; con pocas excepciones, se trata de variantes muy raras. La mayoría de estas variantes se deben a diferencias en un único residuo aminoácido. Los efectos sobre la estructura y la función de la hemoglobina suelen ser muy pequeños, aunque a veces pueden llegar a ser extraordinarios. Cada variante de hemoglobina es el producto de una alteración genética. A cada variante de un gen se le llama alelo. Debido a que los humanos poseen en general dos copias de cada gen, un individuo puede tener dos copias de un alelo (siendo entonces homocigoto para ese gen) o una copia de cada uno de los dos alelos diferentes (heterocigoto).

La anemia falciforme se da en individuos que han heredado el alelo de esta enfermedad de ambos progenitores. Los eritrocitos de estos individuos son anormales y menos numerosos. Además de un número inusualmente elevado de células inmaduras, la sangre contiene muchos eritrocitos alargados, delgados y en forma de media luna que asemejan la hoja de una hoz **(Fig. 5–19)**. Cuando se desoxigena la hemoglobina de las células falciformes (llamada hemoglobina S), ésta pasa a ser insoluble y forma polímeros que se agregan en fibras tubulares **(Fig. 5–20)**. La hemoglobina normal (hemoglobina A) sigue siendo soluble cuando se desoxigena. Las fibras insolubles de la hemoglobina S desoxigenada son las responsables de la deformación en forma de hoz de los eritrocitos y la proporción de células falciformes aumenta en gran medida cuando se desoxigena la sangre.

Las propiedades alteradas de la hemoglobina S son el resultado de la sustitución de un único aminoácido, una Val en lugar de un residuo Glu en la posición 6 de las dos cadenas β. El grupo R de la valina no posee carga eléctrica, mientras que el glutamato tiene una carga negativa a pH 7,4. Por lo tanto la hemoglobina S tiene dos cargas negativas menos que la hemoglobina A, una por cada una de las cadenas β. La sustitución de Glu por Val crea un punto de contacto hidrofóbico "adhesivo" en la posición 6 de la cadena β, que se sitúa en la superficie exterior de la molécula. Estos puntos adhesivos hacen que las moléculas de desoxihemoglobina S se asocien anormalmente entre ellas, formando los largos agregados fibrosos característicos de esta enfermedad. **Proteínas de unión a oxígeno – Defectos en la Hb dan lugar a graves enfermedades genéticas**

Como ya hemos visto, la anemia falciforme se presenta en individuos homocigotos en el alelo falciforme del gen codificante de la subunidad β de la hemoglobina. Los individuos que reciben el alelo falciforme de uno solo de sus progenitores y que por tanto son heterocigotos, sufren una enfermedad más leve llamada rasgo de la anemia falciforme; en estos casos sólo un 1% de sus eritrocitos son falciformes en estado de desoxigenación. Estos individuos pueden tener una vida completamente normal si evitan el ejercicio vigoroso u otros esfuerzos.

La anemia falciforme es una enfermedad dolorosa y que puede ser mortal. Las personas con anemia falciforme sufren crisis recurrentes provocadas por el ejercicio físico. Se sienten débiles, tienen vértigo y les falta el aire, además de sufrir un aumento del pulso y soplos cardíacos. El contenido en hemoglobina de su sangre es sólo la mitad del normal, de 15 a 16 g/100mL, debido a que los eritrocitos falciformes son muy frágiles y se rompen con facilidad, lo que provoca una anemia ("falta de sangre"). Una consecuencia aún más grave es que los capilares quedan bloqueados por los eritrocitos alargados y con formas anormales, provocando un intenso dolor e interfiriendo con las

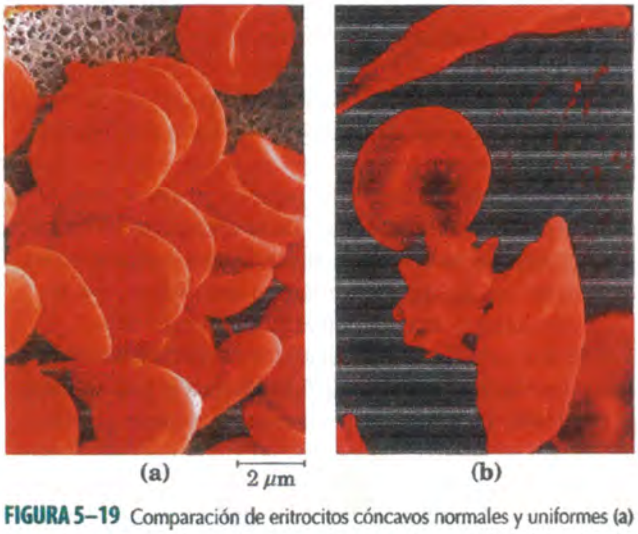


FIGURA 5–19 Comparación de eritrocitos cóncavos normales y uniformes **(a)** con los eritrocitos de formas diversas presentes en la anemia falciforme **(b)**. Estos últimos pueden ser normales, falciformes o estrellados.

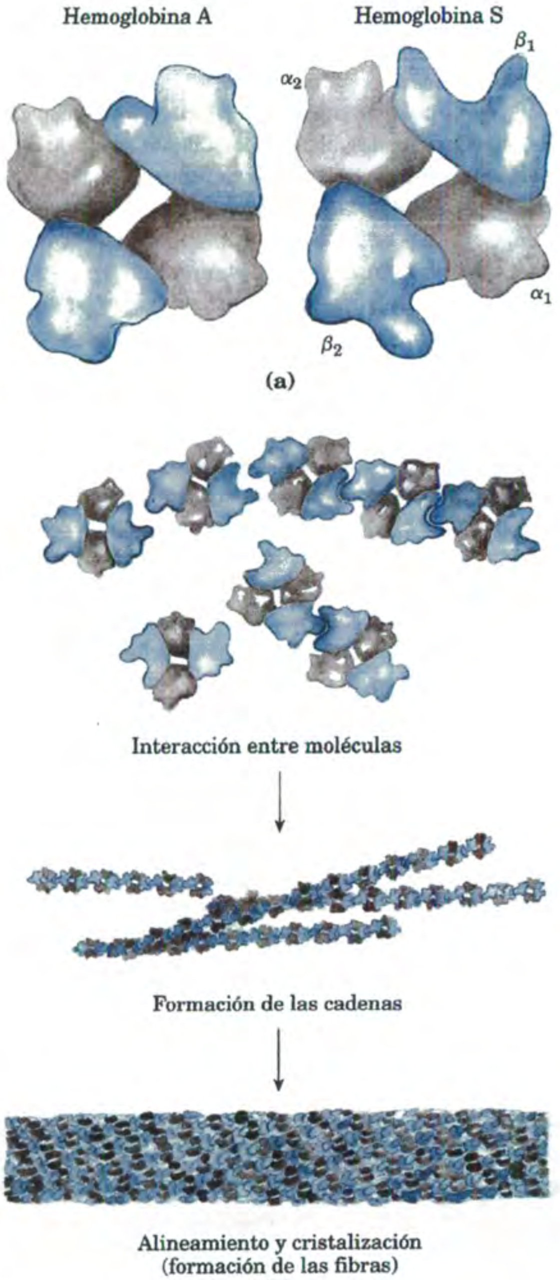


FIGURA 5–20 Hemoglobina normal y hemoglobina de la anemia falciforme. **(a)** Como resultado de un único cambio de aminoácido en las cadenas β se producen diferencias sutiles de conformación entre la hemoglobina A y la hemoglobina S. **(b)** A consecuencia de este cambio la desoxihemoglobina S presenta un parche hidrofóbico en su superficie, que provoca la agregación de las moléculas en cadenas que se alinean en forma de fibras insolubles.

funciones normales de los órganos, siendo ésta una de las causas principales que provocan la muerte temprana de mucha gente que padece esta enfermedad.

Las personas con anemia falciforme suelen morir en su infancia si no reciben tratamiento médico. Sin embargo, el alelo de la anemia falciforme es sorprendentemente común en algunas partes de África. La investigación sobre la persistencia de un alelo con efectos negativos tan evidentes en los individuos homocigotos, llevó al descubrimiento de que este alelo aporta una pequeña pero importante resistencia a formas letales de la malaria en individuos heterocigotos. La selección natural ha dado como resultado una población de alelos en la que se compensan los efectos negativos del estado homocigoto con la resistencia a la malaria que aporta el estado heterocigoto ■

RESUMEN 5.1 Unión reversible de una proteína a un ligando: proteínas de unión a oxígeno

- La función proteica suele implicar interacciones con otras moléculas. Una molécula que se une a una proteína se denomina ligando y el sitio al que se une sitio de fijación de ligando. Las proteínas pueden experimentar cambios conformacionales cuando se une un ligando en un proceso que se llama encaje inducido. En una proteína con múltiples subunidades la unión de un ligando a una subunidad puede afectar la unión del ligando a otras subunidades. La unión de ligandos puede estar regulada.
- La mioglobina contiene un grupo prostético hemo que une oxígeno. El hemo consiste en un único átomo de Fe^{2+} coordinado en un anillo de porfirina. El oxígeno se une reversiblemente a la mioglobina, en un proceso que se puede describir mediante una constante de asociación K_a o una constante de disociación K_d. Para una proteína monomérica como la mioglobina, la fracción de sitios de fijación ocupados por ligandos es una función hiperbólica de la concentración de ligando.
- La hemoglobina adulta normal tiene cuatro subunidades que contienen grupos hemo, dos α y dos β, similares entre ellas y con la mioglobina. La hemoglobina existe en dos estados estructurales interconvertibles, T y R. El estado T es el más estable en ausencia de oxígeno. La unión de oxígeno promueve la transición hacia el estado R.
- La unión de oxígeno a la hemoglobina es alostérica y cooperativa. Al unirse O_2 a un sitio de fijación, la hemoglobina experimenta cambios conformacionales que afectan a los otros sitios de fijación, lo que es un ejemplo de comportamiento alostérico. Los cambios conformacionales entre los estados T y R, mediados por interacciones subunidad–subunidad, producen una unión cooperativa; este comportamiento se describe mediante una curva sigmoidea y se analiza mediante la representación de Hill.
- Se han propuesto dos modelos para explicar la unión cooperativa de ligandos a proteínas con múltiples subunidades: el modelo concertado y el modelo secuencial.
- La hemoglobina también se une a H^+ y CO_2, lo que resulta en la formación de pares iónicos que estabilizan el estado T y hacen disminuir la afinidad de la hemoglobina por el O_2 (efecto Bohr). La unión del oxígeno a la hemoglobina está también modulada por el 2,3-bisfosfoglicerato, que se une y estabiliza el estado T.
- La anemia falciforme es una enfermedad genética causada por la sustitución de un único aminoácido (Glu^6 por Val^6)

en cada una de las cadenas β de la hemoglobina. El cambio genera la aparición de una zona hidrofóbica en la superficie de la hemoglobina que hace que las moléculas se agreguen en haces de fibras. En condiciones de homozigosis, esta enfermedad presenta graves complicaciones.

5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmune y las inmunoglobulinas

Hemos visto como las conformaciones de las proteínas de unión a oxígeno afectan a y son afectadas por la unión de pequeños ligandos (O_2 o CO_2) al grupo hemo. Pero la mayoría de las interacciones proteína–ligando no implican un grupo prostético. En vez de esto, el sitio de fijación de ligando suele ser como el de la hemoglobina para el BPG: una hendidura en la proteína recubierta de residuos aminoácidos dispuestos de tal manera que hacen que la interacción sea altamente específica.

Una discriminación efectiva para los ligandos es la norma para los sitios de fijación, incluso cuando los ligandos tienes diferencias estructurales muy pequeñas.

Todos los vertebrados poseen un sistema inmune capaz de distinguir las moléculas "propias" de las "ajenas" y destruir a continuación las consideradas ajenas. De esta manera, el sistema inmune elimina virus, bacterias y otros patógenos, así como moléculas que puedan representar una amenaza para el organismo. Fisiológicamente, la respuesta del sistema inmune es un entramado complejo de interacciones entre muchas clases de proteínas, moléculas y tipos celulares. Cuando se trata de proteínas individuales, el sistema inmune demuestra como un sistema bioquímico específico y extremadamente sensible puede basarse en la unión reversible entre ligandos y proteínas.

En la respuesta inmune interviene un conjunto de células y proteínas especializadas

La acción inmune es llevada a cabo por una amplia gama de **leucocitos** (glóbulos blancos de la sangre) que incluyen a los **macrófagos** y **linfocitos,** originados todos a partir de células madre no diferenciadas de la médula ósea. Los leucocitos pueden abandonar el torrente sanguíneo y recorrer los tejidos. Cada una de las células sintetiza una o más proteínas capaces de reconocer y unirse a moléculas que podrían ser señal de una infección.

La respuesta inmune es el resultado de la acción de dos sistemas complementarios, el sistema inmune humoral y el celular. El **sistema inmune humoral** (del latín *humor*, "fluido") está dirigido contra infecciones bacterianas y virus extracelulares (los que se encuentran en los fluidos corporales), pero también puede responder a proteínas externas individuales. El **sistema inmune celular** destruye las células propias infectadas por virus, y también parásitos y tejidos ajenos.

La base proteica de la respuesta inmune humoral está formada por unas proteínas solubles llamadas **anticuerpos** o **inmunoglobulinas,** normalmente abreviadas como **Ig.** Las inmunoglobulinas se unen a las bacterias, a los virus o a moléculas grandes identificadas como ajenas, marcándolas para su destrucción. Las inmunoglobulinas constituyen hasta un 20% de las proteínas sanguíneas y son producidas por los **linfocitos B** o **células B,** llamadas así debido a que completan su desarrollo en la médula ósea (en inglés bone marrow).

Los agentes que conforman la base de la respuesta inmune celular son una clase de **linfocitos T** o **células T** (llamadas así porque las últimas fases de su desarrollo tienen lugar en el timo) llamadas **células T citotóxicas** (**células T_C,** también llamadas células T asesinas). El reconocimiento de las células infectadas o de los parásitos implica unas proteínas llamadas **receptores de las células T** que se encuentran en la superficie de las células T_C. Los receptores son proteínas que habitualmente se disponen en la superficie exterior de las células y se extienden a través de la membrana plasmática; reconocen y unen ligandos extracelulares, desencadenando una serie de cambios en el interior de la célula.

Además de las células T citotóxicas también encontramos las **células T *helper*** (**células T_H, células cooperantes** o **auxiliares),** cuya función es producir unas proteínas señalizadoras solubles llamadas citoquinas, entre las que se cuentan las interleuquinas. Las células T_H interaccionan con los macrófagos. Las células T_H participan sólo de manera indirecta en la destrucción de células infectadas y patógenos, estimulando la proliferación selectiva de las células T_C y B que pueden unirse a un antígeno particular. Este proceso, llamado **selección clonal,** aumenta el número de células del sistema inmunitario capaces de responder a un patógeno concreto. La importancia de las células T_H se aprecia claramente en el caso de la epidemia causada por el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), el virus causante del sida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Las células T_H son la diana primaria de la infección por VIH. La eliminación de estas células incapacita progresivamente a la totalidad del sistema inmune. En la tabla 5–2 se resumen las funciones de los diversos leucocitos del sistema inmune.

Cada proteína de reconocimiento del sistema inmune, ya sea un receptor de células T o un anticuerpo producido por una célula B, se une de manera específica a alguna estructura química concreta, distinguiéndola prácticamente de cualquier otra.

TABLA 5–2 Algunos tipos de leucocitos asociados con el sistema inmune

Tipo celular	Función
Macrófagos	Ingestión de grandes partículas y células por fagocitosis
Linfocitos B (células B)	Producción y secreción de anticuerpos
Linfocitos T (células T)	
Células citotóxicas (T_C) (asesinas)	Interaccionan con células infectadas a través de receptores superficie de las células T
Células T auxiliares (*helper*) (T_H)	Interaccionan con macrófagos y secretan citoquinas (interleuquinas) que estimulan la proliferación de las células T_C y T_H, B.

El ser humano es capaz de producir unos 10^8 anticuerpos diferentes con especificidad de unión propia. Dada esta extraordinaria diversidad, es altamente probable que cualquier estructura química de la superficie de un virus o de una célula invasora pueda ser reconocida y unirse a uno o más anticuerpos. La diversidad de los anticuerpos se deriva de la reorganización al azar de una serie de segmentos de los genes de las inmunoglobulinas mediante mecanismos de recombinación genética que se describirán en el Capítulo 25 (véase la Fig. 25–26).

Se utiliza un léxico especializado para describir las interacciones, exclusivas del sistema inmune, que se establecen entre anticuerpos o receptores de las células T y las moléculas a las que se unen. Se conoce como **antígeno** cualquier molécula o patógeno capaz de generar una respuesta inmune. Un antígeno puede ser un virus, una pared bacteriana, una proteína individual u otras macromoléculas. A un antígeno complejo se le pueden unir una serie de anticuerpos diferentes. Un anticuerpo o un receptor de las células T concreto se unirá solamente a una estructura molecular determinada dentro del antígeno denominada **determinante antigénico** o **epitopo.**

Responder a moléculas pequeñas que son intermediarios comunes y productos del metabolismo celular no sería productivo para el sistema inmune. Las moléculas con una M_r <5.000 generalmente no actúan como antígenos. No obstante, cuando estas moléculas pequeñas se unen covalentemente a grandes proteínas en el laboratorio, pueden usarse para originar una respuesta inmune. Estas moléculas pequeñas se denominan **haptenos.** Los anticuerpos producidos como respuesta a los haptenos unidos a proteínas se unirán entonces a las mismas moléculas pequeñas en su forma libre. Este tipo de anticuerpos se emplea algunas veces en el desarrollo de pruebas analíticas que describimos más adelante en este capítulo o también como anticuerpos catalíticos (véase el Recuadro 6–3). A continuación veremos una descripción más detallada de los anticuerpos y de sus propiedades de unión.

Los anticuerpos poseen dos lugares idénticos de unión a antígeno

Las **inmunoglobulinas G (IgG)** son la principal clase de moléculas de anticuerpo y unas de las proteínas más abundantes en el suero sanguíneo. Las IgG tienen cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas largas, llamadas cadenas pesadas, y dos cadenas ligeras, unidas por enlaces no covalentes y puentes disulfuro formando un complejo de M_r 150.000. Las cadenas pesadas de una molécula de IgG interaccionan en un extremo y se abren para interaccionar separadamente con las cadenas ligeras, formando una molécula en forma de Y **(Fig. 5–21)**. En las "bisagras" que separan la base de la IgG de sus ramas, la inmunoglobulina puede ser cortada por proteasas. La rotura con la proteasa papaína libera el fragmento basal, llamado **Fc** debido a que suele cristalizar fácilmente, y las dos ramas, conocidas como **Fab,** los fragmentos de unión a antígeno ("*a*ntigen–*b*inding"). Cada rama tiene un único sitio de fijación de antígeno.

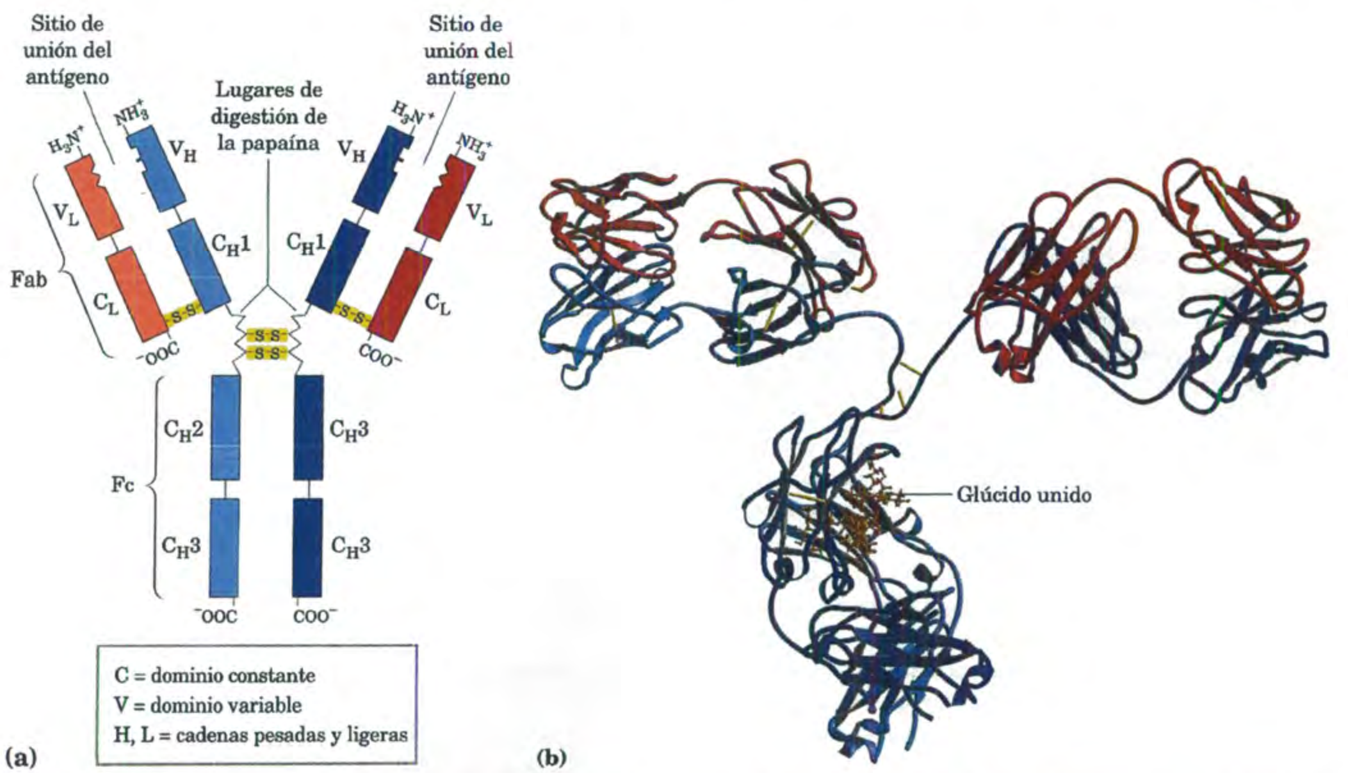


FIGURA 5–21 Inmunoglobulina G. (a) Un par de cadenas pesadas se combina con otro de cadenas ligeras para formar una molécula con forma de Y. Se crean dos sitios de fijación de antígeno por la combinación de los dominios variables de una cadena ligera (V_L) y de una pesada (V_H). La digestión con papaína separa las porciones Fab y Fc de la proteína por la región bisagra. La porción F_C de la molécula contiene también glúcido unido (se muestra en (b)). **(b)** Modelo de cintas de la primera molécula de IgG completamente cristalizada y analizada estructuralmente (PDB ID 1IGT). A pesar de que la molécula contiene dos cadenas pesadas idénticas (en dos tonos de azul) y dos cadenas ligeras idénticas (en dos tonos de rojo), cristaliza según la conformación asimétrica mostrada. La flexibilidad conformacional puede ser importante para la función de las inmunoglobulinas.

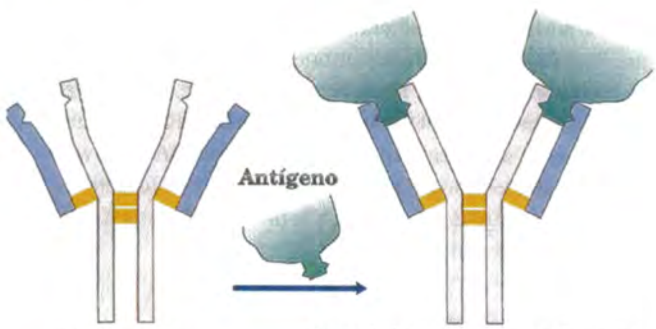


FIGURA 5–22 Unión de la IgG a un antígeno. Para generar un ajuste óptimo con el antígeno, los sitios de unión de la IgG suelen experimentar ligeros cambios de conformación. Un ajuste inducido de este tipo es típico de diversas interacciones entre proteína y ligando.

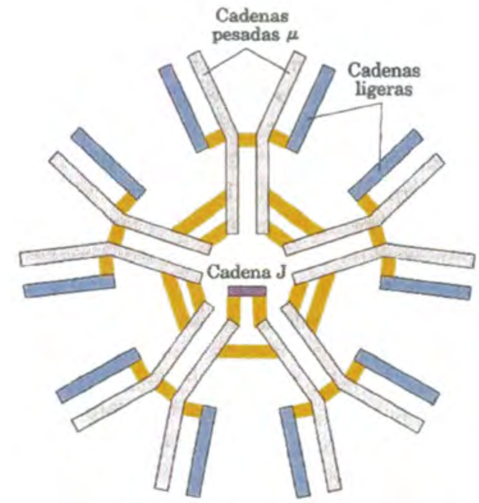


FIGURA 5–23 Pentámero IgM de unidades de inmunoglobulina. El pentámero está entrelazado con enlaces disulfuro (en amarillo). La cadena J es un polipéptido de M_r 20.000 encontrado tanto en la IgA como en la IgM.

La estructura básica de las inmunoglobulinas fue establecida por Gerald Edelman y Rodney Porter. Cada cadena está compuesta por dominios identificables: algunos son constantes en secuencia y estructura de una IgG a otra, otros son variables. Los dominios constantes tienen una estructura característica conocida como **plegamiento tipo inmunoglobulina,** un motivo estructural muy conservado en todas las proteínas de la clase β (Capítulo 4). Hay tres de estos dominios constantes en cada cadena pesada y uno en cada cadena ligera. Las cadenas pesada y ligera poseen además un dominio variable cada una, en el cual se encuentra la mayor parte de la variabilidad en la secuencia de aminoácidos. Los dominios variables se asocian para crear el sitio de fijación del antígeno (Fig. 5–21, **Fig. 5–22**).

En muchos vertebrados las IgG son solamente una de las cinco clases de inmunoglobulinas. Cada clase tiene un tipo característico de cadena pesada, llamadas α, δ, ε, γ y μ, que corresponden a las IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Hay dos tipos de cadena ligera, κ y λ, que están presentes en todas las clases de inmunoglobulinas. Las estructuras globales de las **IgD** y las **IgE** son similares a la de las IgG. Las **IgM** pueden presentarse en forma monomérica, unidas a membrana, o en forma de pentámero entrecruzado de la estructura básica cuando son secretadas **(Fig. 5–23)**. Las **IgA** se encuentran principalmente en secreciones como la saliva, las lágrimas y la leche, pudiendo encontrarse como monómeros, dímeros o trímeros. Las IgM son los primeros anticuerpos producidos por los linfocitos B y el principal anticuerpo en los primeros estadios de la respuesta inmune primaria. Algunas células B empiezan también pronto a producir IgD (con el mismo sitio de fijación de antígeno que la IgM producida por la misma célula) pero la función específica de las IgD no está bien definida.

La IgG descrita anteriormente es el principal anticuerpo en la respuesta inmune secundaria, la respuesta iniciada por una clase de células B denominadas células B de memoria. Como parte de la inmunidad del organismo frente a antígenos ya conocidos, la IgG es la inmunoglobulina más abundante en la sangre. Cuando la IgG se une a una bacteria invasora o a un virus, activa ciertos leucocitos, como los macrófagos, para que engullan y destruyan al invasor, y también activa otros componentes de la respuesta inmune. Unos receptores de la superficie celular de los macrófagos reconocen y unen la región Fc de las IgG. Cuando estos receptores de Fc se unen a un complejo anticuerpo–patógeno el macrófago lo rodea y lo incorpora por fagocitosis **(Fig. 5–24)**.

La IgE juega un papel muy importante en la respuesta alérgica, interaccionando con los basófilos (leucocitos fagocíticos) en la sangre y con las células secretoras de histamina llamadas mastocitos que están ampliamente distribuidas por los tejidos. Esta inmunoglobulina se une por su región Fc a receptores Fc específicos de los basófilos o de los mastocitos. De esta manera, la IgE actúa como una especie de receptor del antígeno. La unión del antígeno induce la secreción por parte de las células de histamina y otras aminas biológicamente activas que provocan dilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Se cree que estos efectos sobre los vasos sanguíneos sirven par facilitar el desplazamiento de las células y proteínas del sistema inmune hacia los lugares de inflamación. También provocan los síntomas normalmente asociados con las alergias. El polen y otros alergenos son reconocidos como extraños, desencadenando una respuesta del sistema inmune que normalmente se reserva para los patógenos. ■

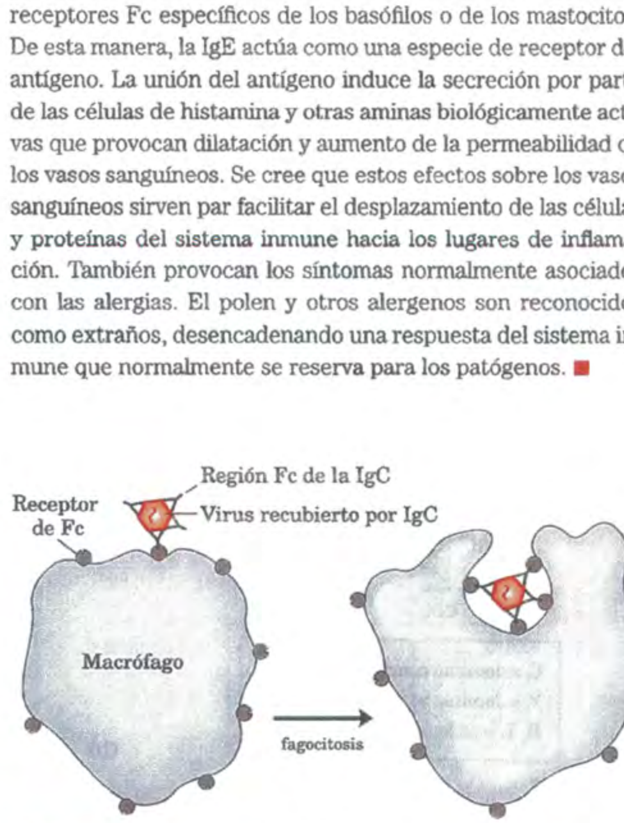


FIGURA 5–24 Fagocitosis por un macrófago de un virus unido a anticuerpo. Las regiones F_C de los anticuerpos unidas a los virus se unen a receptores de F_C situados en la superficie del macrófago, haciendo que el macrófago fagocite al virus y lo destruya.

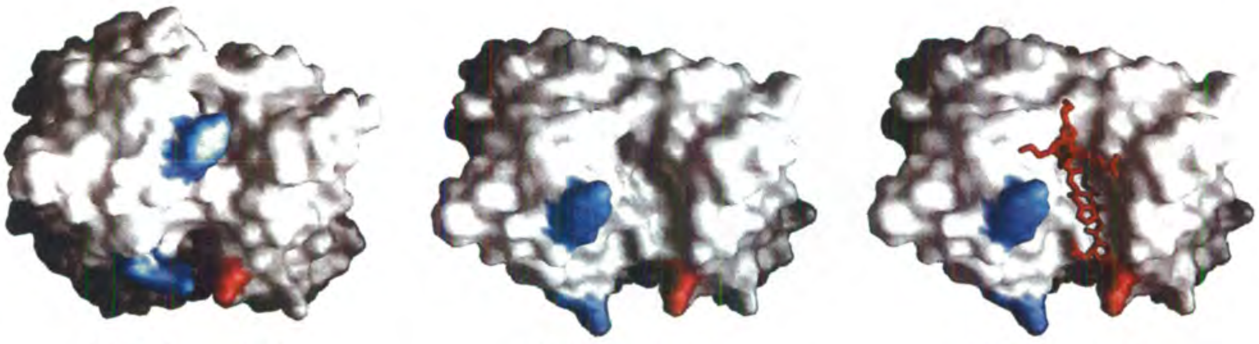


FIGURA 5–25 Encaje inducido en la unión de un antígeno a la IgG. La molécula, mostrada en un contorno de superficie, es el fragmento Fab de una IgG. El antígeno es un péptido pequeño derivado del VIH. Hay dos residuos de la cadena pesada (en azul) y uno de la ligera (en rosa) que están coloreados para proporcionar puntos visuales de referencia. **(a)** Vista del fragmento Fab en ausencia de antígeno visto en dirección hacia el sitio de fijación del antígeno (PDB ID 1GGC). **(b)** La misma perspectiva, pero aquí el fragmento Fab está en la conformación de "unión" (PDB ID 1GGI); el antígeno no está representado para permitir una visión sin impedimentos del sitio de fijación alterado. Observe que la cavidad de unión se ha agrandado y varios grupos han cambiado de posición. **(c)** La misma perspectiva que en **(b)**, pero con el antígeno representado en el sitio de fijación como una estructura roja de varillas.

Los anticuerpos se unen fuertemente y de manera específica al antígeno

La especificidad de unión de un anticuerpo viene determinada por la composición de aminoácidos de los dominios variables de sus cadenas pesada y ligera. Muchos residuos de estos dominios son variables, aunque no en la misma medida. Algunos, principalmente aquellos que recubren el sitio de fijación del antígeno, son hipervariables (especialmente proclives a la variación). La especificidad se debe a la complementariedad química entre el antígeno y su sitio de fijación específico, en términos de forma y localización de grupos cargados, no polares y formadores de puentes de hidrógeno. Por ejemplo, un sitio de fijación con un grupo cargado negativamente puede unir un antígeno con carga positiva en la posición complementaria. En muchos casos, la complementariedad se consigue de modo interactivo gracias a que las estructuras del antígeno y del sitio de fijación se influyen mutuamente durante la aproximación del ligando. A continuación, cambios conformacionales en el anticuerpo y/o en el antígeno permiten una completa interacción entre grupos complementarios. Éste es un ejemplo de encaje inducido El complejo de un péptido derivado del VIH (un antígeno modelo) y una molécula Fab mostrada en la **Figura 5–25** ilustra algunas de estas propiedades. En este caso los cambios en la estructura observados al unirse el antígeno son particularmente llamativos.

Una interacción antígeno–anticuerpo típica es bastante fuerte, caracterizándose por valores de K_d tan bajos como 10^{-10} M (recuérdese que una K_d más baja corresponde a una interacción de unión más fuerte; véase la Tabla 5–1). La K_d refleja la energía derivada de las diversas interacciones iónicas, de enlace de hidrógeno, hidrofóbicas y de van der Waals que estabilizan la unión. La energía de unión necesaria para generar una K_d de 10^{-10} M es de unos 65 kJ/mol.

Las interacciones antígeno-anticuerpo son la base de diversos procesos analíticos importantes

La extraordinaria afinidad y especificidad de unión de los anticuerpos los convierten en valiosos reactivos para análisis. Se emplean dos tipos de anticuerpos: los policlonales y los monoclonales. Los **anticuerpos policlonales** son los producidos por diferentes poblaciones de linfocitos B en respuesta a un antígeno, como podría ser el caso de una proteína inyectada a un animal. Las células de la población de linfocitos B producen anticuerpos que unen específicamente diferentes epitopos dentro del antígeno. Por lo tanto, una preparación policlonal contiene una mezcla de anticuerpos que reconocen diferentes partes de una proteína. Los **anticuerpos monoclonales** se sintetizan por una población de células B idénticas (un **clon**) crecidas en cultivo celular. Estos anticuerpos son homogéneos, todos reconocen el mismo epitopo. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales fueron desarrolladas por George Köhler y Cesar Milstein.

Georges Köhler, 1946–1995

Cesar Milstein, 1927–2002

La especificidad de los anticuerpos tiene utilidades prácticas. Un anticuerpo seleccionado puede unirse covalentemente a una resina y utilizarse en una columna de cromatografía del tipo que se muestra en la Figura 3–17c. Cuando se añade una mezcla de proteínas a la columna, el anticuerpo unirá específicamente su proteína diana y la retendrá en la columna mientras que las otras proteínas escaparán de ellas. La proteína diana puede entonces ser eluída de la resina utilizando una solución salina o algún otro agente. Ésta es una herramienta muy poderosa para la purificación de proteínas.

En otra técnica analítica muy versátil, un anticuerpo puede marcarse radiactivamente o con algún otro reactivo que lo haga

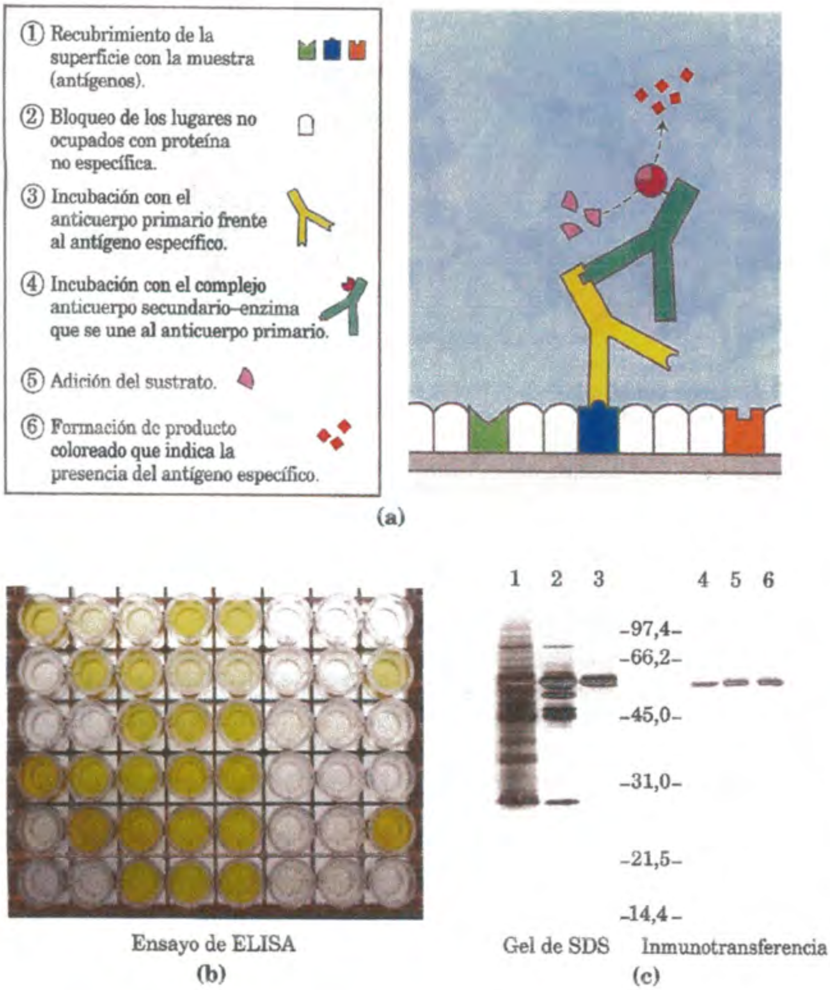


FIGURA 5–26 Técnicas con anticuerpos. La reacción específica de un anticuerpo con su antígeno es la base de diversas técnicas que identifican y cuantifican proteínas específicas en muestras complejas. **(a)** Representación esquemática del método general. **(b)** Un ELISA para comprobar la presencia de anticuerpos frente al virus herpes simplex (VHS) en muestras de sangre. Los pocillos se recubrieron con un antígeno VHS al cual se le unirán los anticuerpos contra el VHS. El segundo anticuerpo es una anti IgG humana unida a la peroxidasa de rábano. Al terminar los pasos mostrados en **(a)**, las muestras de sangre con mayor cantidad de anticuerpos frente al VHS dan un color amarillo más intenso. **(c)** Una inmunotransferencia. Los carriles del 1 al 3 pertenecen a un gel de SDS; muestras pertenecientes a pasos consecutivos de la purificación de una proteína quinasa han sido resueltas electroforéticamente y teñidas con azul de Coomasie. Los carriles del 4 al 6 presentan las mismas muestras después de haber sido transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa, tras separación en un gel de SDS. A continuación, la membrana se "analizó" con un anticuerpo frente a la proteína quinasa. Los números entre el gel y la inmunotransfernecia indican el M_r (en millares).

fácil de detectar. Cuando el anticuerpo se une a la proteína diana, la marca revela la presencia de la proteína en una solución o su localización en un gel o incluso en una célula viva. En la **Figura 5–26** se ilustran algunas variantes de este procedimiento.

Un **ELISA** (*e*nzyme-*l*inked *i*mmuno*s*orbent *a*ssay: análisis del inmunoadsorbente unido a enzima) permite un rastreo rápido y una cuantificación de la presencia de un antígeno en una muestra (Fig. 5–26b). Las proteínas de una muestra se adsorben sobre una superficie inerte, normalmente una placa de poliestireno de 96 pocillos. La superficie se lava con una disolución de una proteína no específica y barata (normalmente caseína de leche descremada en polvo) para bloquear los sitios no ocupados evitando que otras proteínas se unan a ellos en los pasos siguientes. A continuación la superficie se trata con una solución que contenga el anticuerpo primario, un anticuerpo contra la proteína de interés. Se lava el anticuerpo no unido y la superficie se trata con una disolución que contiene un anticuerpo secundario —anticuerpo contra el anticuerpo primario—, conjugado a un enzima que cataliza una reacción que da lugar a la formación de un producto coloreado. Después de la eliminación del anticuerpo secundario no unido se añade el sustrato del enzima conjugado. La formación de producto (medida colorimétricamente) es proporcional a la concentración de la proteína de interés en la muestra.

En un **ensayo de inmunotransferencia** o **inmunoblot** (Fig. 5–26c), las proteínas que se han separado mediante electroforesis en gel se transfieren electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea (de la misma manera que se hace en un ELISA) y a continuación se trata sucesivamente con el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario conjugado con el enzima y el sustrato. Se forma un precipitado coloreado únicamente sobre la banda que contiene la proteína de interés. La inmunotransferencia permite la detección de componentes minoritarios de una muestra y proporciona una aproximación de su masa molecular. **Inmunotransferencia**

Encontraremos otros aspectos de los anticuerpos en capítulos posteriores. Son extremadamente importantes en medicina y nos pueden enseñar muchas cosas sobre la estructura de las proteínas y la acción de los genes.

RESUMEN 5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmune y las inmunologlobulinas

- La respuesta inmune está mediada por interacciones entre un conjunto de leucocitos especializados y sus proteínas asociadas. Los linfocitos T producen receptores de células T. Los linfocitos B producen inmunoglobulinas. Mediante un proceso denominado selección clonal, las células T auxiliares (*helper*) inducen la proliferación de células B y de células T

citotóxicas que producen inmunoglobulinas o de receptores de células T que se unen a un antígeno específico.

- El ser humano posee cinco clases de inmunoglobulinas, con diferentes funciones biológicas para cada una de ellas. La clase más abundante es las de las IgG, proteínas en forma de Y con dos cadenas pesadas y dos ligeras. Los dominios cercanos a los extremos superiores de la Y son hipervariables dentro de la amplia población de las IgG y forman dos sitios de fijación de antígeno.
- Una inmunoglobulina determinada se une generalmente a una única parte, denominada epitopo, de un antígeno más grande. La unión suele implicar un cambio conformacional de la IgG a través de un encaje inducido con el antígeno.

5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares

Los organismos se mueven. Las células se mueven. Los orgánulos y las macromoléculas dentro de las células se mueven. La mayoría de estos movimientos se originan a partir de la actividad de unos fascinantes motores moleculares basados en proteínas. Grandes agregados de proteínas motoras experimentan cambios conformacionales cíclicos que se acumulan en fuerzas direccionales unificadas, para lo que utilizan energía química, normalmente derivada del ATP. La fuerza resultante puede ser pequeña, como la responsable de la separación de los cromosomas en la división celular, o inmensa, como la que eleva en el aire a un tigre de un cuarto de tonelada de peso.

Tal como se puede suponer, las interacciones complementarias entre las proteínas motoras son de los más diversos tipos: iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals en los sitios de unión de las proteínas. Sin embargo, en las proteínas motoras estas interacciones alcanzan niveles extraordinariamente altos de organización espacial y temporal.

Las proteínas motoras son la base de la contracción muscular, la migración de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos, la rotación de los flagelos bacterianos y el movimiento de algunas proteínas a lo largo del DNA. Las proteínas llamadas quinesinas y dineínas se mueven a lo largo de los microtúbulos en las células, transportando orgánulos o reorganizando los cromosomas durante la división celular. Es una interacción de la dineína con los microtúbulos la que origina el movimiento de los flagelos y los cilios de los eucariotas. El movimiento flagelar de las bacterias implica un complicado motor de rotación situado en la base del flagelo (véase la Fig. 19–39). Las helicasas, las polimerasas y otras proteínas se mueven a lo largo del DNA al tiempo que llevan a cabo sus funciones metabólicas sobre el DNA (Capítulo 25). Aquí nos centraremos en el bien estudiado ejemplo de las proteínas contráctiles del músculo esquelético de los vertebrados, utilizándolo como paradigma de la forma en que las proteínas transforman energía química en movimiento.

Las principales proteínas del músculo son la actina y la miosina

La fuerza para la contracción muscular se genera por la interacción de dos proteínas, la miosina y la actina. Estas proteínas están dispuestas en filamentos que llevan a cabo interacciones transitorias y se deslizan unos sobre otros para realizar la contracción. En conjunto la actina y la miosina conforman el 80% de la masa proteica muscular.

La **miosina** (M_r 540.000) tiene seis subunidades: dos cadenas pesadas (cada una con M_r 220.000) y cuatro cadenas ligeras

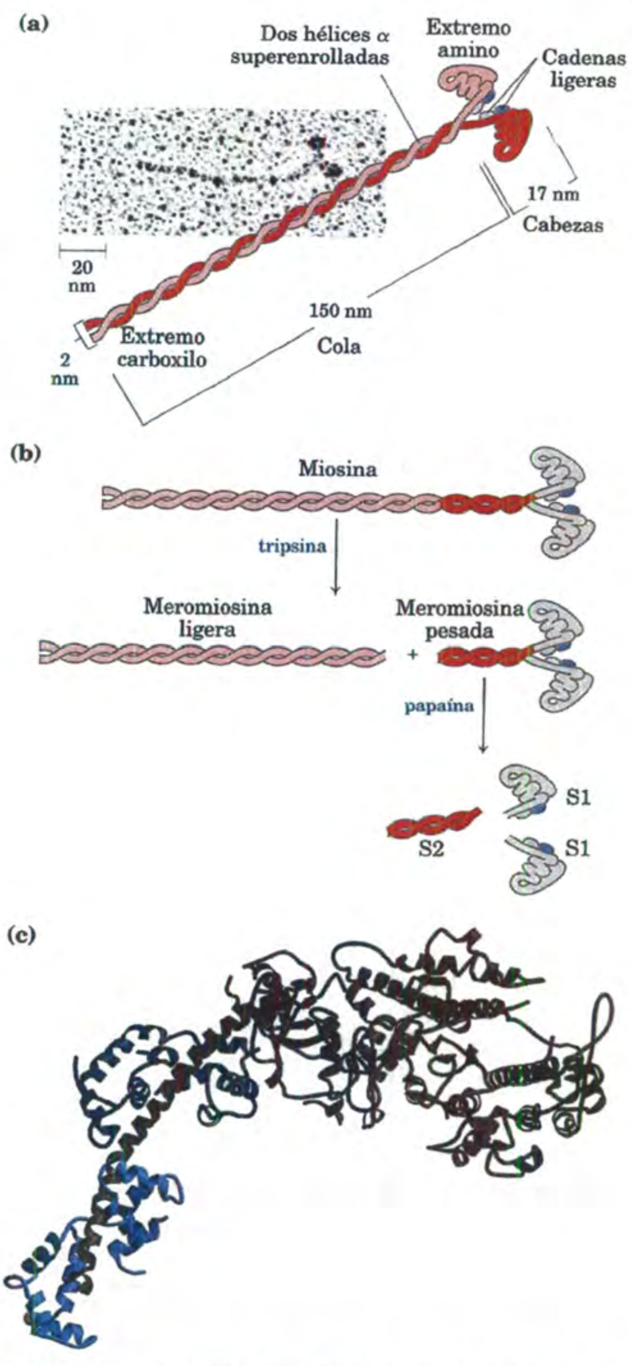


FIGURA 5–27 Miosina. (a) La miosina tiene dos cadenas pesadas (coloreadas en dos tonos rosa), en las que el extremo carboxilo forma un superenrollamiento extendido (cola) y el extremo amino terminal tiene unos dominios globulares (cabezas). Con cada cabeza de miosina hay dos cadenas ligeras asociadas (en azul). (b) La digestión con tripsina y papaína separa las cabezas de miosina (fragmentos S1) de las colas. (c) Representación de cintas del fragmento S1 de la miosina (a partir de coordenadas cedidas por Ivan Rayment). La cadena pesada se muestra en gris, las dos cadenas ligeras se muestran en dos tonos de azul.

(cada una con M_r 20.000). Las cadenas pesadas constituyen la mayor parte de la estructura. Se encuentran dispuestas como hélices α extendidas en su extremo carboxilo terminal, dispuestas unas sobre las otras con un superenrollamiento levógiro formando una fibra del tipo de la α-queratina **(Fig. 5–27a)**. En su extremo amino terminal cada cadena pesada tiene un gran dominio globular donde se encuentra el sitio de hidrólisis del ATP. Las cadenas ligeras están asociadas con los dominios globulares. Tras un breve tratamiento de la miosina con tripsina, la mayor parte de la cola fibrosa se libera por proteólisis, dividiendo a la proteína en dos componentes llamados meromiosina ligera y pesada (Fig. 5–27b). El dominio globular, llamado subfragmento 1 o S1 de la miosina, o simplemente "cabeza" de la miosina, se puede liberar de la meromiosina pesada por tratamiento con papaína. El fragmento S1 es el dominio motor que permite la contracción muscular. Los fragmentos S1 pueden cristalizarse y su estructura global se muestra tal como fue determinada por Ivan Rayment y Hazel Holden en la Figura 5–27c.

En las células musculares, las moléculas de miosina se agregan para formar las estructuras llamadas **filamentos gruesos (Fig. 5–28a)**. Estas estructuras en forma de varilla actúan como núcleo de la unidad contráctil. Varios centenares de moléculas de miosina se disponen en un filamento grueso con sus colas fibrosas asociadas para formar una larga estructura bipolar. Los dominios globulares se proyectan a partir de los dos extremos de esta estructura a modo de grupos dispuestos con regularidad.

La segunda de las proteínas principales del músculo, la **actina**, abunda en prácticamente todas las células eucariotas. En el músculo, las moléculas de actina monomérica llamada actina G (actina *g*lobular: M_r 42.000), se asocian para formar largos polímeros llamados actina F (actina *f*ilamentosa). Los **filamentos delgados** (Fig. 5–28b) están formadas por actina F junto con las proteínas troponina y tropomiosina (que se describen más adelante). La parte filamentosa de los filamentos delgados se asocia al añadirse sucesivas moléculas de actina monomérica a un extremo. Además, cada monómero une ATP y a continuación lo hidroliza a ADP, de manera que todas las moléculas de actina del filamento están acomplejadas con ADP. Esta hidrólisis de ATP por la actina se produce sólo en el ensamblaje de los filamentos; no contribuye directamente a la energía gastada en la contracción muscular. Cada monómero de actina del filamento delgado puede unirse fuertemente y de manera específica a una cabeza de miosina (Fig. 5–28c).

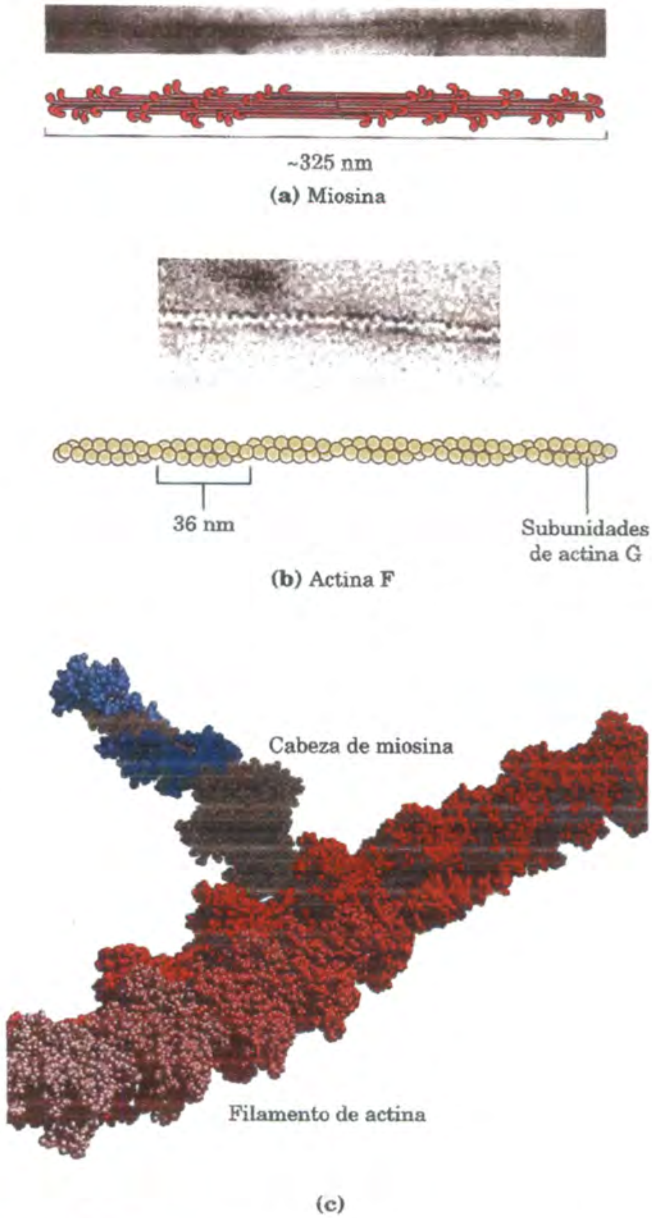


FIGURA 5–28 Principales componentes del músculo. (a) Los agregados de miosina forman una estructura bipolar conocida como filamento grueso. (b) La actina F resulta del ensamblaje filamentoso de los monómeros de actina G, que polimerizan en parejas adquiriendo el aspecto de dos filamentos que se enrollan en espiral uno sobre otro con una orientación dextrógira. (c) Modelo espacial de esferas de un filamento de actina (diferentes tonos de rojo) con una cabeza de miosina (en gris y dos tonos de azul) unida a un monómero de actina dentro del filamento (a partir de coordenadas cedidas por Ivan Rayment).

Otras proteínas adicionales organizan los filamentos delgado y grueso en estructuras ordenadas

El músculo esquelético consiste en haces paralelos de **fibras musculares,** siendo cada fibra una única célula multinucleada de gran tamaño, de 20 a 100 μm de diámetro, formada a partir de la fusión de muchas células y con una longitud en ocasiones igual a la del propio músculo. Cada fibra contiene a su vez unas 1.000 **miofibrillas**, de unos 2 μm de diámetro, estando formada cada una por un gran número de filamentos delgados y gruesos acomplejados con otras proteínas y dispuestos de manera regular **(Fig. 5–29)**. Un sistema de vesículas membranosas planas llamado **retículo sarcoplasmático** rodea cada miofibrilla. Al examinarse al microscopio electrónico, las fibras musculares muestran regiones alternas de alta y baja densidad electrónica, llamadas **bandas A** e **I** (Fig. 5–29b, c). Las bandas A e I se deben a la disposición de los filamentos gruesos y delgados, los cuales están alineados y se solapan parcialmente. La banda I es la región del haz cuyo corte sagital sólo contendría filamentos delgados. La banda A, más oscura, es igual de larga que los filamentos gruesos e incluye la región de solapamiento entre filamentos gruesos y delgados paralelos. En la bisección de la banda I hay una fina estructura llamada **disco Z,** perpendicular a los filamentos delgados y que actúa como un ancla a la cual se unen estos filamentos. La banda A también posee una

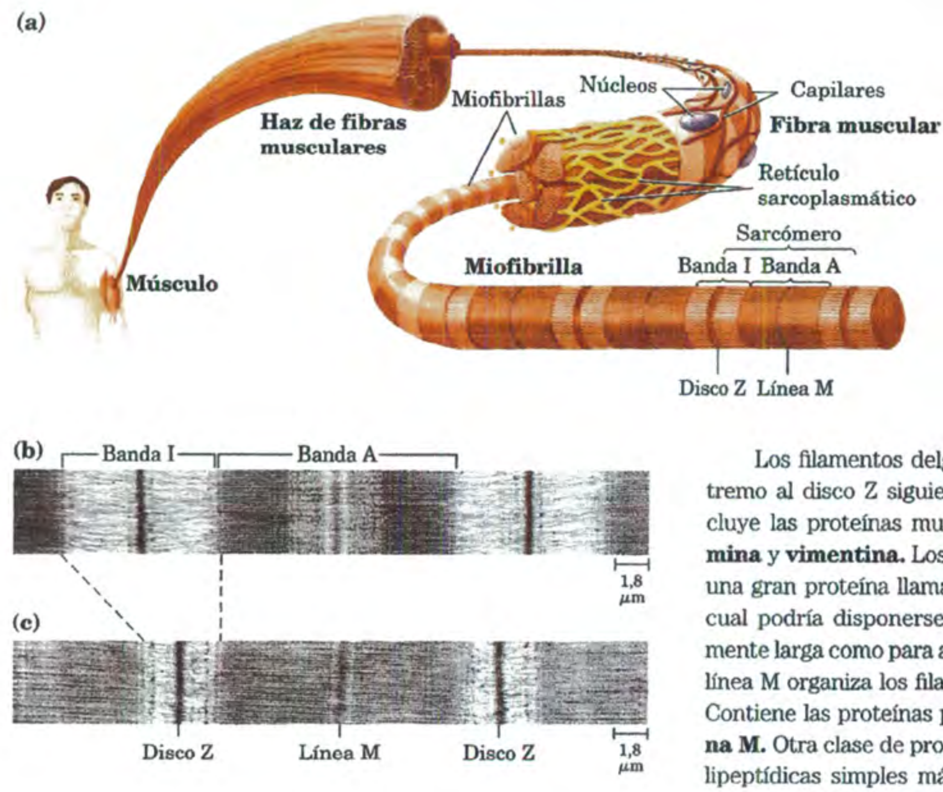


FIGURA 5–29 Músculo esquelético. **(a)** Las fibras musculares están formadas por células multinucleadas alargadas que se originan por la fusión de muchas células precursoras. Dentro de las fibras hay muchas miofibrillas (aquí se muestran sólo seis), rodeadas por el retículo sarcoplasmático membranoso. La organización de los filamentos gruesos y delgados dentro de la miofibrilla le confiere una apariencia estriada. Cuando el músculo se contrae las bandas I se estrechan y los discos Z se acercan entre ellos, como se observa en las micrografías electrónicas del músculo relajado **(b)** y contraído **(c)**.

estructura similar en su bisectriz, la **línea M** o disco M, que es una región de alta densidad electrónica en el centro de los filamentos gruesos. El conjunto de la unidad contráctil, los haces de filamentos gruesos solapados en cada uno de sus extremos con haces de filamentos delgados, se denomina **sarcómero.** La disposición de los haces yuxtapuestos permite que los filamentos gruesos y delgados se deslicen unos sobre otros (mediante un mecanismo que discutiremos más adelante), provocando un acortamiento progresivo de cada sarcómero **(Fig. 5–30)**.

Los filamentos delgados de actina están unidos en un extremo al disco Z siguiendo un patrón regular. El conjunto incluye las proteínas musculares minoritarias **α-actinina, desmina** y **vimentina.** Los filamentos delgados también contienen una gran proteína llamada **nebulina** (~7.000 aminoácidos), la cual podría disponerse en forma de una hélice α suficientemente larga como para abarcar toda la longitud del filamento. La línea M organiza los filamentos gruesos de una manera similar. Contiene las proteínas **paramiosina, proteína C** y la **proteína M.** Otra clase de proteínas llamadas **titinas,** las cadenas polipeptídicas simples más largas que se conocen (la titina del músculo cardíaco humano tiene 26.926 residuos aminoácidos), unen los filamentos gruesos al disco Z, lo que proporciona un nivel adicional de organización a la estructura global. Se cree que tanto la nebulina como la titina actúan como "pautas moleculares", regulando la longitud de los filamentos gruesos y delgados respectivamente. La titina se extiende del disco Z a la línea M, regulando la longitud del sarcómero y evitando una hiperextensión del músculo. En los vertebrados la longitud característica de un sarcómero varía de un tejido muscular a otro, un fenómeno atribuible en gran medida a la presencia de diferentes variantes de titina en los tejidos.

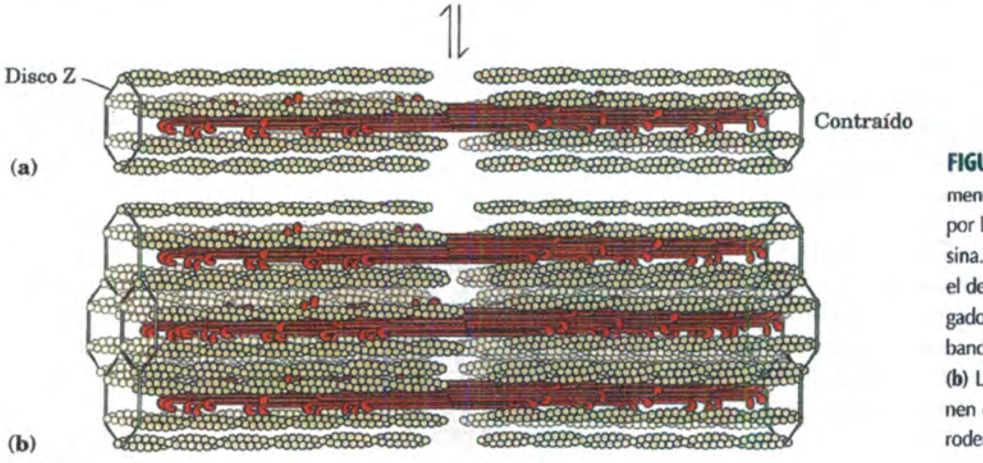


FIGURA 5–30 Contracción muscular. Los filamentos gruesos son estructuras bipolares creadas por la asociación de muchas moléculas de miosina. **(a)** La contracción muscular se produce por el deslizamiento de los filamentos gruesos y delgados entre ellos de manera que los discos Z de bandas I vecinas se aproximan unos a los otros. **(b)** Los filamentos gruesos y delgados se disponen de manera que cada filamento grueso está rodeado por seis filamentos delgados.

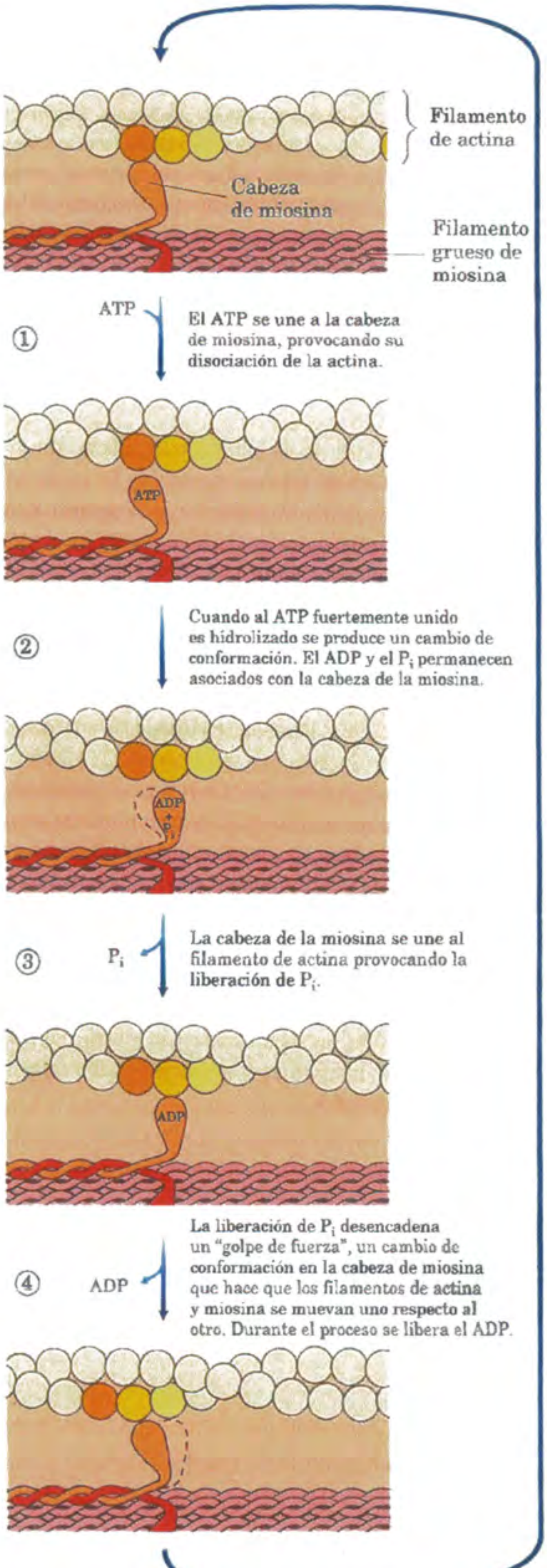


FIGURA 5–31 Mecanismo molecular de la contracción muscular. Una serie de cambios de conformación en la cabeza de miosina, acoplados al ciclo hidrolítico del ATP, hacen que la miosina se separe de una subunidad de actina y se asocie a otra más alejada del filamento de actina. De esta manera las cabezas de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados, arrastrando a los filamentos gruesos dentro del entramado de filamentos delgados (véase la Fig. 5–30).

Los filamentos gruesos de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados de actina

La interacción entre la actina y la miosina, igual que cualquier otra entre proteínas y ligandos, está basada en enlaces débiles. Cuando el ATP no está unido a la miosina, una cara de la cabeza de ésta se une fuertemente a la actina (**Fig. 5–31**). Cuando el ATP se une a la miosina y es hidrolizado a ADP y fosfato, se producen una serie de cambios de conformación coordinados mediante los cuales la miosina libera la subunidad F de la actina y se une a otra subunidad en una posición más lejana en el filamento delgado.

El ciclo consta de cuatro pasos principales (Fig. 5–31). En el paso ①, el ATP se une a la miosina produciendo un cambio conformacional que consiste en la apertura de una hendidura en la miosina, a consecuencia del cual se deshace la interacción actina–miosina, liberándose la actina. A continuación el ATP se hidroliza en el paso ②, provocando un cambio conformacional en la proteína, que pasa a un estado de "alta energía" que hace que la cabeza de miosina se mueva y cambie su orientación con respecto al filamento delgado de actina. La miosina se une, entonces, débilmente a una subunidad de actina F más cercana al disco Z que la que acaba de liberar. En el paso ③ se produce otro cambio conformacional cuando el fosfato, producto de la hidrólisis del ATP, es liberado de la miosina. Este cambio consiste en el cierre de la hendidura de la miosina, fortaleciendo la unión actina–miosina. Inmediatamente a continuación se produce el paso final ④, un "golpe de energía" en el que la conformación de la cabeza de miosina vuelve a su estado de reposo original, con un cambio en su orientación relativa con respecto a la actina unida que hace que la cola de la miosina se aproxime al disco Z. A continuación se libera ADP para completar el ciclo. Cada ciclo genera entre 3 y 4 pN (piconewtons) de fuerza y mueve el filamento grueso de 5 a 10 nm con respecto al filamento delgado.

Debido al gran número de cabezas de miosina presentes en un filamento grueso, en cualquier momento habrá algunas de ellas (probablemente entre el 1% y el 3%) unidas a filamentos delgados. Esto evita que los filamentos gruesos puedan deslizarse hacia atrás cuando una cabeza individual de miosina libera la subunidad de actina a la que estaba unida. Así el filamento grueso se desliza activamente hacia adelante sobre los delgados adyacentes. Este proceso, coordinado entre los muchos sarcómeros de una fibra muscular, genera la contracción muscular.

La interacción entre la actina y la miosina debe ser regulada de manera que la contracción muscular se produzca sólo como respuesta a las señales adecuadas con origen en el sistema nervioso. De esta regulación se encarga un complejo formado por dos proteínas, la **tropomiosina** y la **troponina** (**Fig. 5–32**). La tropomiosina se une al filamento delgado, bloqueando los sitios de fijación para los grupos de las cabezas de miosina. La troponina es una proteína que une Ca^{2+}. El impulso nervioso provoca la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. El Ca^{2+} liberado se une a la troponina (otra interacción proteína–ligando) y provoca de este modo un cambio conformacional en los complejos de tropomiosina–troponina, exponiendo los sitios de fijación para miosina de los filamentos delgados. A continuación se produce la contracción.

El músculo esquelético en funcionamiento requiere dos tipos de funciones moleculares que son comunes entre las proteínas: unión y catálisis. La interacción entre la actina y la miosina,

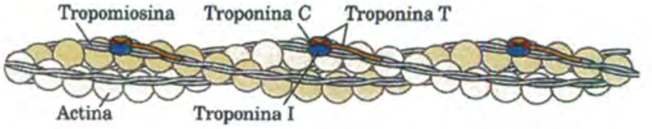


FIGURA 5–32 Regulación de la contracción muscular por la tropomiosina y la troponina. La tropomiosina y la troponina están unidas a la actina F en los filamentos delgados. En el músculo relajado, estas proteínas están dispuestas alrededor de los filamentos de actina y bloquean los sitios de unión para la miosina. La tropomiosina es una superhélice de dos cadenas de hélice α, la misma estructura que la de la α-queratina (véase la Fig. 4–10). Forma polímeros cabeza–cola que se doblan alrededor de las dos cadenas de actina. La troponina se une al complejo actina–tropomiosina a intervalos regulares de 38,5 nm. La troponina está formada por tres subunidades diferentes: I, C y T. La troponina I impide la unión de la cabeza de miosina a la actina; la troponina C tiene un sitio de unión de Ca^{2+} y la troponina T une el complejo entero de troponina a la tropomiosina. Cuando el músculo recibe una señal nerviosa para iniciar la contracción, se libera Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (véase la Fig. 5–29a) y se une a la troponina C. Produce un cambio de conformación en la troponina C que altera las posiciones de la troponina I y de la tropomiosina de manera que se libera la inhibición por la troponina I y se permite la contracción muscular.

una interacción de tipo proteína–ligando igual que la que se da entre las inmunoglobulinas y los antígenos, es reversible y no modifica a las moléculas que participan en ella. Sin embargo el ATP se hidroliza a ADP y P_i cuando se une a la miosina. La miosina no es sólo una proteína de unión a actina es también una ATPasa, un enzima. La función de los enzimas como catalizadores de transformaciones químicas es el tema del próximo capítulo.

RESUMEN 5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares

- Las interacciones proteína–ligando adquieren un grado especial de organización espacial y temporal en las proteínas motoras. La contracción muscular es el resultado de un conjunto de interacciones entre miosina y actina, acopladas a la hidrólisis del ATP a cargo de la miosina.
- La miosina consiste en dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras que forman un dominio enrollado superhelicoidal (cola) y un dominio globular (cabeza). Las moléculas de miosina se organizan en filamentos gruesos que se deslizan sobre filamentos delgados compuestos principalmente por actina. La hidrólisis de ATP en la miosina se acopla a una serie de cambios conformacionales en la cabeza de la miosina que conducen a la disociación de la miosina de una subunidad de actina F y su posterior reasociación con otra subunidad, en una posición más lejana en el filamento delgado. De este modo, la miosina de desliza a lo largo de los filamentos de actina.
- La contracción muscular es estimulada por la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático. El Ca^{2+} se une a la proteína troponina, provocando un cambio conformacional en un complejo troponina–tropomiosina que da lugar al inicio del ciclo de interacciones actina–miosina.

Palabras clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

ligando 153
sitio de fijación 153
encaje inducido 153
hemo 154
porfirina 154
globinas 155
expresión de equilibrio 155
constante de asociación, K_a 156
constante de disociación, K_d 156
proteína alostérica 162
ecuación de Hill 164
efecto Bohr 166
linfocitos 170
anticuerpo 170
inmunoglobulina 170
linfocitos B o **células B** 170
linfocitos T o **células T** 170
antígeno 171
epitopo 171
hapteno 171
plegamiento tipo inmunoglobulina 172
anticuerpos policlonales 173
anticuerpos monoclonales 173
ELISA 174
miosina 175
actina 176
sarcómero 177

Bibliografía

Proteínas de unión a oxígeno

Ackers, G.K. & Hazzard, J.H. (1993) Transduction of binding energy into hemoglobin cooperativity. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 385–390.

Changeux, J.P. & Edelstein, S.J. (2005) Allosteric mechanisms of signal transduction *Science* **308**, 1424–1428.

Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G., & Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **6**, 365–385.
La publicación en la cual se propuso el modelo secuencial.

Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J.-P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88–118.
El modelo concertado fue propuesto por primera vez en esta publicación de referencia.

Olson, J.S. & Phillips, G.N., Jr. (1996) Kinetic pathways and barriers for ligand binding to myoglobin. *J. Biol. Chem.* **271**, 17,593–17,596.

Perutz, M.F. (1989) Myoglobin and haemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 42–44.

Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M., & Dodson, G.G. (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 1–34.

Squires, J.E. (2002) Artificial blood. *Science* **295**, 1002–1005.
Una buena descripción del imponente reto tecnológico que significa el intento de mimetizar la altamente sofisticada función de la sangre en el transporte de oxígeno.

Proteínas del sistema inmune

Cooper, M.D. & Alder, M.N. (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815–822.
Un ensayo interesante que describe los orígenes del sistema inmune humano

Davies, D.R. & Chacko, S. (1993) Antibody structure. *Acc. Chem. Res.* **26**, 421–427.

Davies, D.R., Padlan, E.A., & Sheriff, S. (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439–473.

Kindt, T.J., Osborne, B.A., & Goldsby, R.A. (2007) *Kuby Immunology*, 6th edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Ploegh, H.L. (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**, 248–253.

Thomsen, A.R., Nansen, A., & Christensen, J.P. (1998) Virus-induced T cell activation and the inflammatory response. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **231**, 99–123.

Yewdell, J.W. & Haeryfar, S.M.M. (2005) Understanding presentation of viral antigens to CD8(+) T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 651–682.

Motores moleculares

Finer, J.T., Simmons, R.M., & Spudich, J.A. (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368**, 113–119.

La tecnología moderna revela las fuerzas que afectan a las proteínas motores individuales.

Geeves, M.A. & Holmes, K.C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687–728.

Huxley, H.E. (1998) Getting to grips with contraction: the interplay of structure and biochemistry. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 84–87.

Una interesante perspectiva histórica sobre el esclarecimiento del mecanismo de la contracción muscular.

Labeit, S. & Kolmerer, B. (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**, 293–296.

Una descripción de algunas de las mayores proteínas conocidas.

Molloy, J.E. & Veigel, C. (2003) Myosin motors walk the walk. *Science* **300**, 2045–2046.

Rayment, I. (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 15,850–15,853.

La contracción muscular desde una perspectiva estructural.

Rayment, I. & Holden, H.M. (1994) The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 129–134.

Spudich, J.A. (1994) How molecular motors work. *Nature* **372**, 515–518.

Vale, R.D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467–480.

Problemas

1. Relación entre las constantes de afinidad y de disociación La proteína A tiene un sitio de fijación para el ligando X con una K_d de 10^{-6} M. La proteína B tiene un sitio de fijación para el ligando X con una K_d de 10^{-9} M. ¿Qué proteína tiene mayor afinidad para el ligando X? Explique el razonamiento. Convierta la K_d en K_a para ambas proteínas.

2. Cooperatividad negativa ¿Cuál de las siguientes situaciones daría lugar a una curva de Hill con $n_H < 1,0$? Explique su razonamiento en cada caso.

(a) La proteína tiene múltiples subunidades, cada una con un único sitio de fijación de ligando. La unión del ligando a un sitio disminuye la afinidad de unión de los otros sitios de fijación de ligando.

(b) La proteína es un único polipéptido con dos sitios de fijación de ligando, cada uno de ellos con una afinidad diferente para el ligando.

(c) La proteína es un único polipéptido con un único sitio de fijación de ligando. Una vez purificado, el preparado proteico es heterogéneo y contiene algunas moléculas de proteína que están parcialmente desnaturalizadas, por lo que poseen una menor afinidad de unión para el ligando.

3. Afinidad por el oxígeno en la hemoglobina ¿Cuál es el efecto de los siguientes cambios sobre la afinidad de la hemoglobina por el O_2? (a) Un descenso del pH del plasma sanguíneo de 7,4 a 7,2. (b) Un descenso de la presión parcial de CO_2 en los pulmones de 6 kPa (aguantando la respiración) a 2 kPa (normal). (c) Un aumento del nivel de BPG de 5 mM (altitud normal) a 8 mM (grandes altitudes). (d) Un incremento en CO desde 1,0 partes por millón (ppm) en una atmósfera interior normal hasta 30 ppm en una casa en la que el horno de gas funciona mal o tiene pérdidas.

4. Unión reversible de ligandos La proteína calcineurina se une a la proteína calmodulina con una velocidad de asociación de $8,9 \times 10^3\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una constante de disociación global, K_d, de 10 nM. Calcule la velocidad de disociación, k_d, y exprésela en las unidades adecuadas.

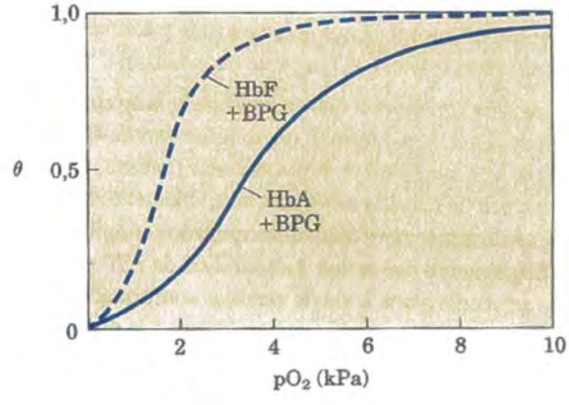
5. Cooperatividad en la hemoglobina En circunstancias adecuadas, la hemoglobina se disocia en sus cuatro subunidades. La subunidad α aislada une oxígeno, pero la curva de saturación de O_2 es hiperbólica en lugar de sigmoidea. Además, la unión de oxígeno a la subunidad α aislada no se ve afectada por la presencia de H^+, CO_2 o BPG. ¿Qué indican estas observaciones sobre el origen de la cooperatividad en la hemoglobina?

6. Comparación de las hemoglobinas fetal y materna Los estudios sobre transporte de oxígeno en mamíferos en estado de gestación han demostrado que las curvas de saturación por O_2 de las sangres materna y fetal son claramente diferentes cuando se miden en las mismas condiciones. Los eritrocitos fetales contienen una variante estructural de la hemoglobina, la HbF, que consiste en dos subunidades α y dos subunidades γ ($\alpha_2\gamma_2$), mientras que los eritrocitos maternos contienen la HbA ($\alpha_2\beta_2$).

(a) ¿Cuál de las dos hemoglobinas tiene una mayor afinidad por el oxígeno en condiciones fisiológicas, la HbA o la HbF? Explíquelo.

(b) ¿Cuál es el significado fisiológico de la diferente afinidad por el oxígeno?

(c) Cuando se retira todo el BPG presente en muestras de HbA y HbF las curvas de saturación de O_2 (y como consecuencia las afinidades por el O_2) se desplazan hacia la izquierda. No obstante, en esta situación la HbA tiene una mayor afinidad por el oxígeno que la HbF. Cuando se reintroduce el BPG las curvas de saturación de O_2 vuelven a la normalidad, tal como se muestra en el gráfico. ¿Cuál es el efecto del BPG sobre la afinidad por el O_2 de la hemoglobina? ¿Cómo puede utilizarse esta información para explicar las diferentes afinidades por el O_2 de las hemoglobinas fetal y materna?



7. Variantes de la hemoglobina En la naturaleza se presentan casi 500 variantes de la hemoglobina. La mayoría son el resultado de un único cambio de aminoácido en una cadena polipeptídica de globina. Algunas variantes provocan enfermedades aunque no todas tienen efectos negativos. A continuación se presenta una breve muestra:

HbS (Hb de la célula falciforme): sustitución de un Glu por una Val en la superficie

Hb Cowtown: eliminación de un par iónico implicado en la estabilización del estado T

Hb Memphis: sustitución de un residuo polar no cargado por otro de tamaño similar en la superficie

Hb Bibba: sustitución de una Leu por una Pro implicada en una hélice α

Hb Milwaukee: sustitución de una Val por un Glu

Hb Providence: sustitución de una Lys por una Asn que se proyecta normalmente hacia la cavidad central del tetrámero

Hb Philly: sustitución de una Tyr por una Phe, que rompe el enlace de hidrógeno en la interfase $\alpha_1\beta_1$

Explique su elección para cada una de las siguientes situaciones:

(a) La variante de Hb que tendrá *menor* probabilidad de provocar síntomas patológicos.

(b) La variante o variantes que tengan más probabilidad de mostrar valores de pI diferentes a los de la HbA al analizarlas en un gel de enfoque isoeléctrico.

(c) La variante o variantes que tengan más posibilidades de mostrar una disminución en la unión de BPG y un aumento de la afinidad global de la hemoglobina por el oxígeno.

8. Unión de oxígeno y estructura de la hemoglobina Se utiliza la ingeniería genética para modificar la interfase entre subunidades de hemoglobina. Las variantes resultantes se presentan en disolución principalmente como dímeros $\alpha\beta$ (tetrámeros $\alpha_2\beta_2$ hay pocos, o ninguno). Estas variantes, ¿unirán oxígeno más débilmente o más fuertemente? Explique su respuesta.

9. Unión reversible (aunque fuerte) a un anticuerpo Un anticuerpo se une a un antígeno con una K_d de 5×10^{-8} M. ¿A qué concentración de antígeno θ será igual a: (a) 0,2, (b) 0,5. (c) 0,6, (d) 0,8?

10. Uso de anticuerpos para demostrar las relaciones entre estructura y función en las proteínas Un anticuerpo monoclonal se une a la actina G pero no a la actina F. ¿Qué nos dice esto sobre el epitopo reconocido por el anticuerpo?

11. El sistema inmune y las vacunas El organismo huésped necesita tiempo, a menudo días, para presentar una respuesta inmune frente a un nuevo antígeno, pero las células de memoria permiten una respuesta rápida frente a los patógenos a los que se ha tenido una exposición previa. A menudo, una vacuna que protege frente una determinada infección vírica suele consistir en un virus muerto o inactivado o en proteínas aisladas a partir de una proteína de la envuelta vírica. Normalmente la vacuna no provoca infección ni enfermedad cuando se inyecta en un paciente humano, aunque "enseña" al sistema inmune cómo son esas partículas víricas, estimulando la producción de células de memoria. Cuando hay una infección posterior, estas células pueden unirse al virus y desencadenar una rápida respuesta inmune. Algunos patógenos, incluido el VIH, han desarrollado mecanismos para eludir la acción del sistema inmune, haciendo que sea muy difícil el desarrollo de vacunas efectivas. ¿Qué estrategia podría utilizar un patógeno para eludir al sistema inmune? Suponga que el huésped dispone de anticuerpos, receptores T o ambos, capaces de unirse a cualquier estructura que pueda aparecer en la superficie de un patógeno y que, una vez unidos, el patógeno es destruido.

12. El modo en que nos quedamos "tiesos" Cuando un vertebrado superior se muere, sus músculos quedan rígidos al ser privados de ATP, un estado llamado *rigor mortis*. Explique la base molecular de este fenómeno.

13. Los sarcómeros desde otro punto de vista La simetría de los filamentos gruesos y delgados dentro de un sarcómero es tal que cada filamento grueso suele estar rodeado por seis filamentos delgados dispuestos en forma hexagonal. Dibuje una sección sagital (corte transversal) de una miofibrilla: (a) en la línea M, (b) a través de la banda I, (c) a través de la región densa de la banda A, (d) a través de la región menos densa de la banda A, adyacente a la línea M (véase la Fig. 5–29b, c).

Bioquímica en Internet

14. Lisozima y anticuerpos Para poder apreciar completamente cómo funcionan las proteínas en una célula es muy útil tener una visión tridimensional de cómo interactúan las proteínas con otros componentes celulares. Afortunadamente esto es posible utilizando las bases de datos de proteínas que se encuentran en la Web y programas de visualización molecular tridimensional. Algunos visualizadores requieren la descarga de un programa o de un conector (plug–in); algunos de ellos pueden dar problemas cuando se usan con ciertos sistemas operativos o navegadores; algunos requieren el uso de un código de órdenes definidas y otros ofrecen interfases de uso más sencillo. Sugerimos que visite la dirección www.umass.edu/microbio/rasmol y lea la información sobre RasMol, Protein Explorer y Jmol First Glance. Escoja el visualizador de mayor compatibilidad con su sistema operativo, navegador y nivel de experiencia. A continuación descargue e instale los programas o conectores que necesite.

En este ejercicio examinará las interacciones entre el enzima lisozima (Capítulo 4) y el fragmento Fab del anticuerpo antilisozima. Utilice el identificador del PDB 1FDL para explorar la estructura del complejo entre el fragmento Fab de IgG1 y la lisozima (complejo antígeno–anticuerpo). Para responder a las siguientes preguntas, use la información de la página de Resumen de la Estructura del Protein Data Bank (www.rcsb.org) y visualice la estructura utilizando RasMol, Protein Explorer o Jmol First Glance.

(a) ¿Qué cadenas del modelo tridimensional corresponden al fragmento de anticuerpo y cuales al antígeno (lisozima)?

(b) ¿Qué tipo de estructura secundaria predomina en este fragmento Fab?

(c) ¿Cuántos residuos aminoácidos hay en las cadenas pesadas y ligeras del fragmento Fab y en la lisozima? Estime el porcentaje de la molécula de lisozima que interacciona con el sitio de fijación de antígeno del fragmento de anticuerpo.

(d) Identifique los residuos aminoácido específicos de la lisozima y de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de Fab que están situados en la interfase antígeno–anticuerpo. ¿Son estos residuos contiguos en la secuencia primaria de la cadena polipeptídica?

15. Explorando las interacciones reversibles de proteínas y ligandos con gráficos animados **Utilice los gráficos animados para las ecuaciones 5–8, 5–11, 5–14 y 5–16 para trabajar con los ejercicios siguientes.**

(a) Unión reversible de un ligando a una proteína simple, sin cooperatividad. Para la ecuación 5–8, genere una gráfica de θ frente a [L] (ejes horizontal y vertical, respectivamente). Examine las gráficas generadas cuando K_d se ajusta a 5, 10, 20 y 100 μM. Una mayor afinidad de la proteína por el ligando significa mayor fijación a concentraciones menores de ligando. Suponga que cuatro proteínas diferentes presentan estos cuatro valores diferentes de K_d para el ligando L. ¿Qué proteína tendría mayor afinidad por L?

Examine la gráfica generada cuando K_d = 10 μM. ¿Cuál es el incremento de θ cuando [L] aumenta desde 0,2 a 0,4 μM? ¿Cuál es el incremento de θ cuando [L] aumenta desde 40 a 80 μM?

Puede realizar el mismo ejercicio para la Ecuación 5–11. Convierta [L] a pO_2 y K_d a P_{50}. Examine las curvas generadas

cuando P_{50} se ajusta a 0,5, 1, 2 y 10 kPa. Para la curva generada a P_{50} = 1 kPa, ¿cuál es la variación de θ cuando la pO_2 aumenta desde 0,02 a 0,04 kPa? ¿Y desde 4 a 8 kPa?

(b) Unión cooperativa de un ligando a una proteína múltiples subunidades. Utilizando la ecuación 5–14, genere una curva de fijación de una proteína y un ligando con una K_d = 10 μM y n = 3. Observe el matiz en la definición de K_d en la Ecuación 5–16. En la misma gráfica, añada una curva para una proteína con K_d = 20 μM y n = 3. Observe ahora cómo cambian ambas curvas cuando se pasa a n = 4. Genere las representaciones de Hill (Ec. 5–16) para cada uno de estos casos. Para valores de K_d = 10 μM y n = 3, ¿Cuál es el valor de θ cuando [L] = 20 μM?

(c) Siga explorando estas ecuaciones mediante la variación de los parámetros utilizados hasta ahora.

Problemas de análisis de datos

16. Función proteica Durante la década de 1980, la resolución a la que se conocían las estructuras de actina y miosina era tan baja como la de la Figura 5–28a, b. A pesar de que se sabía que la parte S1 de la miosina se unía a actina e hidrolizaba ATP, existía mucha discusión acerca de donde se generaba la fuerza de contracción en la molécula de miosina. En aquel momento se propusieron dos modelos alternativos para explicar el mecanismo de generación de fuerza en la miosina.

Según el modelo de la "bisagra", S1 se unía a actina, pero la fuerza de arrastre se generaba por contracción de la "región bisagra" en la cola de la miosina. La región bisagra está en la parte de meromiosina pesada de la molécula de miosina, cerca de donde la tripsina libera por digestión la meromiosina ligera (véase la Fig. 5–27b). Éste es aproximadamente el punto llamado "Dos hélices α superenrolladas" de la Figura 5–27a. Según el modelo "S1", la fuerza de arrastre se generaba en la misma "cabeza" S1 y la cola servía tan solo para fines de soporte estructural.

Se llevaron a cabo muchos experimentos sin que dieran lugar a conclusiones claras. En 1987, James Spudich y colaboradores en la Universidad de Stanford publicaron un estudio que, sin ser concluyente, daba un gran paso en la resolución de esta controversia.

Las técnicas de DNA recombinante no estaban entonces lo suficientemente desarrolladas para poder estudiar este tema in vivo, por lo que Spudich y colaboradores usaron un interesante ensayo de motilidad in vitro. El alga *Nitella* tiene células extremadamente largas, a menudo de varios centímetros de longitud y de aproximadamente 1 mm de diámetro. En estas células hay fibras de actina que se distribuyen según su eje longitudinal y las células se pueden abrir longitudinalmente y exponer sus fibras de actina. Spudich y su grupo habían observado que cuentas de plástico recubiertas de miosina podían "caminar" a lo largo de estas fibras en presencia de ATP, del mismo modo que la miosina hacía en la contracción muscular.

Para llevar a cabo estos experimentos usaron un método mejor definido para unir la miosina a las cuentas. Las "cuentas" eran aglomerados de células bacterianas muertas (*Staphylococcus aureus*). Estas células tienen una proteína en su superficie que se une a la región Fc de moléculas de anticuerpo (Fig. 5–21a). Los anticuerpos, por su parte, se unen a varios lugares (desconocidos) de la cola de la molécula de miosina. Cuando se preparan complejos cuenta–anticuerpo–miosina con moléculas intactas de miosina, se mueven a lo largo de las fibras de actina de *Nitella* en presencia de ATP.

(a) Dibuje un diagrama que muestre el aspecto que podría tener un complejo cuenta–anticuerpo–miosina a nivel molecular.

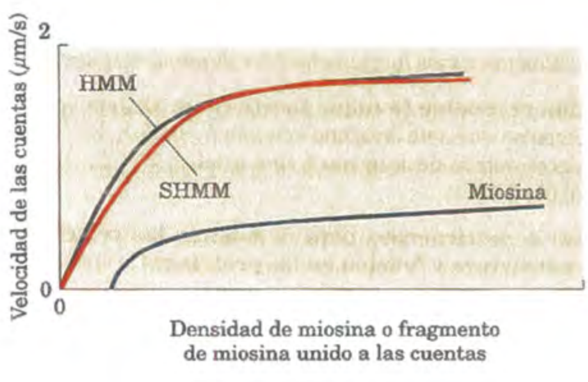
(b) ¿Por qué era necesario ATP para que las cuentas se movieran a lo largo de las fibras de actina?

(c) Spudich y colaboradores usaron anticuerpos que se unían a la cola de la miosina. ¿Por qué habría fallado este experimento si hubieran utilizado un anticuerpo que se uniera a la parte S1 que es la que normalmente se une a actina? ¿Por qué habría fallado este experimento si hubieran utilizado un anticuerpo que se uniera a actina?

Para concentrarse en la parte de la molécula de miosina responsable de la producción de fuerza, Spudich y colaboradores usaron tripsina para producir dos moléculas de miosina parciales (véase la Fig. 5–27): (1) meromiosina pesada (HMM), generada mediante una breve digestión de miosina con tripsina; HMM contiene la parte S1 y la parte de la cola que incluye la bisagra, y (2) meromiosina pesada corta (SHMM), generada por una digestión más larga de HMM con tripsina; SHMM contiene S1 y una parte más corta de la cola que no incluye la bisagra. Una digestión breve de miosina con tripsina produce HMM y meromiosina ligera (Fig. 5–27) por rotura de un único enlace peptídico específico en la molécula de miosina.

(d) ¿Cuál es la razón de que la tripsina pueda atacar este enlace antes que a todos los demás de la miosina?

Spudich y colaboradores prepararon complejos de cuenta–anticuerpo–miosina con cantidades variables de miosina, HMM y SHMM y midieron sus velocidades sobre las fibras de actina de *Nitella* en presencia de ATP. En el gráfico siguiente se representan sus resultados.



(e) ¿Qué modelo ("S1" o "bisagra") es consistente con estos resultados? Explique su razonamiento.

(f) Proponga una explicación plausible para el hecho de que la velocidad de las cuentas aumente con el aumento de la densidad de la miosina.

(g) Proponga una explicación plausible para el hecho de que la velocidad de las cuentas llegue a una meseta a altas densidades de miosina.

La digestión más larga con tripsina necesaria para producir SHMM tenía un efecto secundario: otra rotura específica de la cadena polipeptídica de la miosina además de la que se producía en la cola. El segundo lugar de corte estaba en la cabeza S1.

(h) En base a esta información, ¿por qué resulta sorprendente que SHMM sea todavía capaz de mover las cuentas a lo largo de las fibras de actina?

(i) Se vio que la estructura de la cabeza S1 permanecía intacta en SHMM. Proponga una explicación plausible para el hecho de que la proteína esté todavía intacta y sea funcional a pesar de que se haya roto la cadena polipeptídica y ya no sea continua.

Referencias

Hynes, T.R., Block, S.M., White, B.T., & Spudich, J.A. (1987) Movement of myosin fragments in vitro: domains involved in force production. *Cell* **48**, 953–963.

> Esta condición podría cumplirse en el caso de que las moléculas, una vez combinadas con el enzima, se encontraran a una distancia un poco mayor que su distancia de equilibrio cuando están unidas covalentemente, pero más cerca que su distancia de equilibrio cuando se encuentran libres... Usando el símil de Fischer de la llave y la cerradura, la llave no encaja perfectamente en la cerradura sino que ejerce una cierta tensión sobre ella.
>
> —*J.B.S. Haldane,* Enzymes, *1930*

> La catálisis se puede describir formalmente como la estabilización del estado de transición mediante la unión fuerte del catalizador.
>
> —*William P. Jencks, artículo en* Advances in Enzymology, *1975*

6

Enzimas

Existen dos condiciones fundamentales para la vida. En primer lugar, la entidad viva ha de poder autorreplicarse (un tema que se considera en la Parte III); en segundo lugar, ha de poder catalizar reacciones químicas eficiente y selectivamente. La importancia central de la catálisis puede sorprender pero es fácil demostrarla. Como se describió en el Capítulo 1, los sistemas vivos utilizan la energía de su entorno. Muchos de nosotros, por ejemplo, consumimos cantidades sustanciales de sacarosa –azúcar de mesa común– como un tipo de combustible, generalmente en forma de alimentos y bebidas dulces. La conversión de la sacarosa en CO_2 y H_2O en presencia de oxígeno es un proceso altamente exergónico, que libera energía libre que podemos utilizar para pensar, movernos, saborear y ver. Sin embargo, una bolsita de azúcar se puede almacenar durante años sin que sufra ninguna transformación evidente a CO_2 y H_2O. Siendo este proceso químico termodinámicamente favorable, es, sin embargo, ¡muy lento! Aun así, cuando un humano (o casi cualquier otro organismo) consume sacarosa, la energía química se libera en segundos. La diferencia está en la catálisis. Sin catálisis, las reacciones químicas que, como la de la oxidación de la sacarosa, son necesarias para mantener la vida, no podrían darse en una escala útil de tiempo.

En este capítulo dirigimos, pues, nuestra atención hacia los catalizadores de las reacciones en los sistemas biológicos: los enzimas, las proteínas más notables y de mayor especialización. Los enzimas tienen un gran poder catalítico, a menudo muy superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, aceleran espectacularmente las reacciones químicas específicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Hay pocos catalizadores no biológicos que tengan todas estas propiedades.

Los enzimas están en el centro de todos los procesos bioquímicos. Actuando en secuencias organizadas catalizan cientos de reacciones consecutivas en las que se degradan nutrientes, se conserva y transforma la energía química y se fabrican las macromoléculas biológicas a partir de precursores sencillos.

El estudio de los enzimas también tiene una importancia práctica inmensa. En algunas enfermedades, especialmente en las que son heredables genéticamente, puede haber una carencia, o incluso una ausencia total, de uno o más enzimas. La actividad excesiva de un enzima específico puede dar lugar también a situaciones patológicas. La medición de la actividad enzimática en el plasma sanguíneo, eritrocitos o muestras de tejido son importantes en el diagnóstico de ciertas enfermedades. Muchos fármacos ejercen sus efectos biológicos mediante su interacción con enzimas. Los enzimas se usan también como herramientas importantes en ingeniería química, tecnología alimentaria y agricultura.

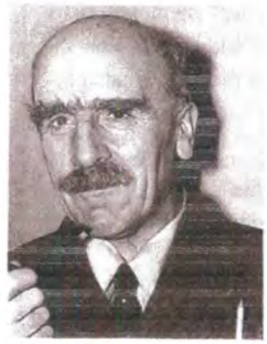
El capítulo empieza con la descripción de las propiedades de los enzimas y los principios fundamentales de su poder catalítico. Sigue una introducción a la cinética enzimática, disciplina que proporciona gran parte del marco necesario para cualquier discusión sobre los enzimas. Se dan seguidamente algunos ejemplos de mecanismos enzimáticos que ilustran los principios introducidos previamente en el capítulo. Acabamos con una discusión sobre la regulación de la actividad enzimática.

6.1 Introducción a los enzimas

Gran parte de la historia de la bioquímica es la historia de la investigación enzimática. Los catalizadores biológicos se reconocieron como tales y fueron descritos por primera vez a finales del siglo XVIII, en estudios sobre la digestión de la carne por secreciones del estómago; la investigación continuó durante el

Eduard Buchner, 1860–1917

James Sumner, 1887–1955



J.B.S. Haldane, 1892–1964

siglo XIX con el examen de la conversión del almidón en azúcar por la saliva y diversos extractos vegetales. Hacia 1850 Louis Pasteur llegó a la conclusión de que la fermentación del azúcar a alcohol por la levadura estaba catalizada por "fermentos". Postuló que tales fermentos son inseparables de la estructura de las células de levadura vivas; este punto de vista, denominado vitalismo, se mantuvo durante décadas. El descubrimiento de Eduard Buchner en 1897 de que los extractos de levadura pueden fermentar el azúcar a alcohol demostró que las moléculas que intervienen en la fermentación pueden continuar funcionando cuando se separan de la estructura de las células vivas. El experimento de Buchner significó inmediatamente el fin de las nociones vitalistas y el alumbramiento de la ciencia de la bioquímica. Más tarde, Frederick W. Kühne dio el nombre de **enzimas** a las moléculas detectadas por Buchner.

El aislamiento y cristalización de la ureasa por James Sumner en 1926 proporcionó un gran impulso a los primeros estudios sobre los enzimas. Sumner encontró que los cristales de ureasa consistían exclusivamente en proteína y postuló que todos los enzimas son proteínas. A falta de otros ejemplos esta idea fue discutida durante algún tiempo. La conclusión de Sumner sólo se aceptó ampliamente cuando más tarde, en la década de 1930, John Northrop y Moses Kunitz cristalizaron la pepsina, la tripsina y otros enzimas digestivos, y encontraron que también eran proteínas. Durante este período, J.B.S. Haldane escribió un tratado denominado *Enzymes* (*Enzimas*). Aunque aún no estaba clara la naturaleza molecular de los enzimas, Haldane apuntó la atractiva sugerencia de que las interacciones por enlaces débiles entre el enzima y su sustrato podrían ser utilizadas para catalizar una reacción. Esta brillante idea está en el centro de nuestro conocimiento actual sobre la catálisis enzimática.

Desde las últimas décadas del siglo XX se han purificado millares de enzimas, de los que se ha elucidado su estructura y explicado su mecanismo de acción.

La mayoría de enzimas son proteínas

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalítico (Capítulo 26), todos los enzimas son proteínas. Su actividad catalítica depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si un enzima se desnaturaliza o se disocia en sus subunidades, la actividad catalítica suele desaparecer. Si se descompone un enzima en sus aminoácidos constituyentes, siempre se destruye su actividad catalítica. Así, las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas son esenciales para su actividad catalítica.

Los enzimas, al igual que otras proteínas, tienen masas moleculares relativas que van desde unos 12.000 hasta más de 1 millón. Algunos enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que sus residuos aminoácidos. Otros requieren un componente químico adicional llamado **cofactor.** El cofactor puede ser uno o varios iones inorgánicos tales como Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} o Zn^{2+} (Tabla 6–1) o una molécula orgánica o metaloorgánica compleja denominada **coenzima.** Los coenzimas actúan como transportadores transitorios de grupos funcionales específicos (Tabla 6–2). La mayoría de ellos son derivados de vitaminas, nutrientes orgánicos que son necesarios en pequeñas cantidades en la dieta. Describiremos con más detalle los coenzimas cuando nos volvamos a encontrar con ellos en las rutas metabólicas descritas en la Parte II. Algunos enzimas requieren *tanto* un coenzima *como* uno o más iones metálicos para su actividad. Un coenzima o ión metálico unido covalentemente o de manera muy fuerte a la proteína enzimática se denomina **grupo prostético.** Un enzima completo y catalíticamente activo junto con su coenzima y/o iones metálicos se denomina **holoenzima.** La parte proteica del enzima se denomina **apoenzima** o **apoproteína.** Finalmente, algunos enzimas son modificados covalentemente por fosforilación, glucosilación y otros procesos. Gran parte de estas alteraciones intervienen en la regulación de la actividad enzimática.

Los enzimas se clasifican según la reacción catalizada

Muchos enzimas se han bautizado añadiendo el sufijo "-asa" al nombre de su sustrato o a una palabra o frase que describe su actividad. Así, la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la DNA polimerasa cataliza la polimerización de nucleótidos en la síntesis del DNA. Otros enzimas recibieron nombres muy generales, antes de que se supiera cuál era su reacción específica. Por ejemplo, un enzima que actúa en la digestión de la comida se llamó pepsina, del griego *pepsis*, "digestión", y el lisozima reci-

TABLA 6–1 Algunos iones inorgánicos que actúan como cofactores enzimáticos

Iones	Enzimas
Cu^{2+}	Citocromo oxidasa
Fe^{2+} o Fe^{3+}	Citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa
K^{+}	Piruvato quinasa
Mg^{2+}	Hexoquinasa, glucosa 6-fosfatasa, piruvato quinasa
Mn^{2+}	Arginasa, ribonucleótido reductasa
Mo	Dinitrogenasa
Ni^{2+}	Ureasa
Se	Glutatión peroxidasa
Zn^{2+}	Carbónico anhidrasa, alcohol deshidrogenasa, carboxipeptidasas A y B

TABLA 6–2 Algunos coenzimas que actúan como portadores transitorios de átomos o grupos funcionales específicos

Coenzima	Ejemplos de algunos grupos químicos transferidos	Precursor en la dieta para los mamíferos
Biocitina	CO_2	Biotina
Coenzima A	Grupos acilo	Ácido pantoténico y otras moléculas
5´-Desoxiadenosilcobalamina (coenzima B_{12})	Átomos de H y grupos alquilo	Vitamina B_{12}
Flavina adenina dinucleótido	Electrones	Riboflavina (vitamina B_2)
Lipoato	Electrones y grupos acilo	No se requiere en la dieta
Nicotinamida adenina dinucleótido	Ión hidruro (:H^-)	Acido nicotínico (niacina)
Piridoxal fosfato	Grupos amino	Piridoxina (vitamina B_6)
Tetrahidrofolato	Grupos monocarbonados	Folato
Tiamina pirofosfato	Aldehídos	Tiamina (vitamina B_1)

Nota: La estuctura y modo de acción de estos coenzimas se describe en la Parte II de este libro.

bió su nombre por su capacidad para lisar (romper) las paredes celulares bacterianas. En otros casos el nombre procede de sus fuentes de origen o del modo en que se obtuvieron: la tripsina, que recibió su nombre del griego *tryein*, “desgastar”, se obtuvo frotando tejido pancreático con glicerina. A veces el mismo enzima tiene dos o más nombres, o dos enzimas diferentes tienen el mismo nombre. Debido a tales ambigüedades y al número constantemente creciente de enzimas descubiertos, se ha adoptado por acuerdo internacional un sistema de nomenclatura y clasificación de los enzimas. Este sistema distribuye los enzimas en seis clases, cada una de ellas con diferentes subclases, según el tipo de reacción catalizada (Tabla 6–3). A cada enzima se le asigna un número clasificatorio que consta de cuatro partes y un nombre sistemático, el cual identifica la reacción catalizada. Por ejemplo, el nombre sistemático formal del enzima que cataliza la reacción

$$\text{ATP} + \text{D-glucosa} \longrightarrow \text{ADP} + \text{D-glucosa 6-fosfato}$$

es la ATP:glucosa fosfotransferasa, que indica que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP a la glucosa. El número de clasificación de este enzima (número E.C., por *E*nzyme *C*ommission) es 2.7.1.1. El primer número (2) denota el nombre de la clase (transferasa); el segundo número (7), la subclase (fosfotransferasa); el tercer número (1), fosfotransferasas con un grupo hidroxilo como aceptor, y el cuarto número (1), que D-glucosa es el aceptor del grupo fosforilo. En muchos casos se utiliza un nombre común de uso más frecuente (en este caso hexoquinasa). La lista y la descripción completa de los miles de enzimas conocidos se mantienen actualizadas por el Comité de Nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzym). Este capítulo se dedica mayoritariamente a los principios y propiedades comunes a todos los enzimas.

RESUMEN 6.1 Introducción a los enzimas

- La vida depende de la existencia de catalizadores poderosos y específicos: los enzimas. Prácticamente todas las reacciones bioquímicas son catalizadas por un enzima.
- Con la excepción de unas pocas moléculas de RNA catalítico, todos los enzimas conocidos son proteínas. Muchos necesitan de coenzimas no proteicos o cofactores para desempeñar su acción catalítica.
- Los enzimas se clasifican de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan. Todos los enzimas tienen números y nombres formales del sistema E.C. y la mayoría tienen también nombres comunes.

TABLA 6–3 Clasificación internacional de enzimas

N.º de clase	Nombre de clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidorreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C—C, C—S, C—O y C—N mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP o a un cofactor similar

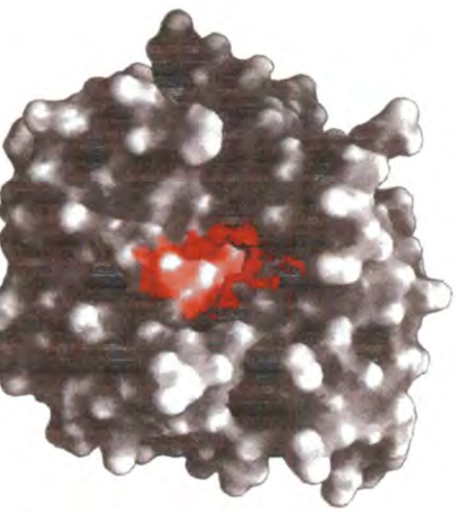


FIGURA 6–1 Fijación de un sustrato al sitio activo de un enzima. La quimotripsina unida a un sustrato en rojo (PDB ID 7GCH). Algunos aminoácidos clave del sitio activo se muestran como manchas rojas en la superficie del enzima.

6.2 Funcionamiento de los enzimas

La catálisis enzimática de las reacciones es esencial para los sistemas vivos. En condiciones biológicas, las reacciones no catalizadas tienden a ser lentas. La mayoría de moléculas biológicas son muy estables en las condiciones de pH neutro, temperatura suave y ambiente acuoso presentes en el interior de las células. Además, muchos procesos químicos comunes son desfavorables o poco probables en el ambiente celular, tales como la formación transitoria de intermediarios cargados inestables o la colisión de dos o más moléculas con la orientación precisa requerida para la reacción. En pocas palabras, las reacciones necesarias para digerir los alimentos, enviar señales nerviosas o contraer el músculo no se dan a una velocidad útil sin catálisis.

Un enzima soluciona estos problemas al proporcionar un ambiente específico dentro del cual una reacción determinada puede transcurrir a mayor velocidad. El rasgo distintivo de una reacción catalizada enzimáticamente es que tiene lugar dentro de los confines de una bolsa del enzima denominada **sitio activo (Fig. 6–1)**. La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa el enzima se denomina **sustrato.** La superficie del sitio activo del enzima está revestida con residuos aminoácidos con grupos sustituyentes que se unen al sustrato y catalizan su transformación química. A menudo, el sitio activo recubre el sustrato y lo secuestra completamente de la disolución. El complejo enzima–sustrato, cuya existencia fue propuesta por primera vez por Charles-Adolphe Wurtz en 1880, es de importancia central en la acción de los enzimas. Es también el punto de partida de los tratamientos matemáticos que definen el comportamiento cinético de las reacciones catalizadas por enzimas, así como de las descripciones teóricas de los mecanismos enzimáticos.

Los enzimas alteran las velocidades de reacción pero no los equilibrios

Se puede escribir una reacción enzimática sencilla como

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P \qquad (6\text{–}1)$$

donde E, S y P representan el enzima, el sustrato y el producto, respectivamente. ES y EP son complejos transitorios del enzima con el sustrato y con el producto, respectivamente.

Para entender la catálisis, hemos de apreciar en primer lugar la importante distinción entre equilibrios de reacción y velocidades de reacción. La función de un catalizador es aumentar la *velocidad* de una reacción. Los catalizadores no modifican los *equilibrios* de reacción. Cualquier reacción, por ejemplo $S \rightleftharpoons P$, se puede describir mediante un diagrama de la coordenada de reacción **(Fig. 6–2)**, una descripción de los cambios energéticos de la reacción. Tal como se introdujo en el Capítulo 1, la energía en los sistemas biológicos se describe en función de la energía libre, *G*. En el diagrama de la coordenada se representa la energía libre del sistema frente al progreso de la reacción (coordenada de la reacción). El punto de partida tanto para la reacción hacia la izquierda como hacia la derecha se denomina **estado basal,** que es la contribución a la energía libre del sistema de una molécula promedio (S o P) bajo un conjunto de condiciones dadas.

CONVENCIÓN CLAVE: Para describir los cambios de energía libre de las reacciones, los químicos definen un conjunto de condiciones estándar (temperatura 298 K; presión parcial de cada gas 1 atm o 101,3 kPa; concentración de todos los solutos de 1 M) y expresan el cambio de energía libre de un sistema reaccionante como ΔG°, la **variación de energía libre estándar.** Dado que en los sistemas bioquímicos participa normalmente el H^+ en concentraciones muy lejanas de 1 M, los bioquímicos definen la **variación de la energía libre estándar bioquímica** $\Delta G'^\circ$, como la variación de energía libre estándar *a pH 7,0*; emplearemos esta definición a lo largo de todo el libro. En el Capítulo 13 se dará una definición más completa de $\Delta G'^\circ$. ■

El equilibrio entre S y P refleja la diferencia en energía libre de sus estados basales. En el ejemplo que se muestra en la Figura 6–2, la energía libre del estado basal de P es inferior a la de S, por lo $\Delta G'^\circ$ que de la reacción es negativo y el equilibrio favorece a P. La posición y la dirección de este equilibrio *no* están afectadas por ningún catalizador.

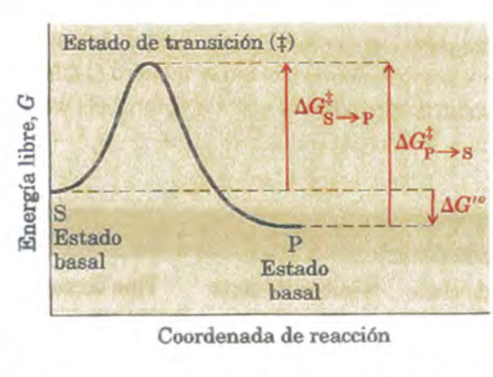


FIGURA 6–2 Diagrama de la coordenada de reacción. Se representa la energía libre del sistema frente al progreso de la reacción $S \rightarrow P$. Un diagrama de este tipo constituye una descripción de los cambios energéticos durante la reacción y el eje horizontal (coordenada de reacción) refleja los cambios químicos progresivos (como rotura o formación de enlaces) a medida que S se convierte en P. Se indican las energías de activación, $\Delta G^\ddagger$, para las reacciones $S \rightarrow P$ y $S \rightarrow P$. $\Delta G'^\circ$ es el cambio de energía libre estándar global en la dirección $S \rightarrow P$.

Un equilibrio favorable no indica que la conversión S → P sea rápida. La *velocidad* de una reacción depende de un parámetro totalmente diferente. Existe una barrera energética entre S y P que representa la energía requerida para el alineamiento de los grupos reactivos, la formación de cargas inestables transitorias, los reordenamientos de enlaces y otras transformaciones que se requieren para que la reacción tenga lugar en cualquiera de las dos direcciones. Esto viene representado por la "colina" energética de las Figuras 6–2 y 6–3. Para que haya reacción las moléculas han de superar esta barrera por lo que se deben llevar a un nivel energético superior. En la cumbre de la colina energética existe un punto en el que la caída hacia el estado S o P es igualmente probable (en cualquier caso, el camino es de bajada). Es lo que se denomina el **estado de transición.** El estado de transición no es una especie química con estabilidad significativa, por lo que no se ha de confundir con un intermedio de reacción. Es un momento molecular fugaz en el que acontecimientos tales como rotura o formación de enlaces y desarrollo de cargas han llegado al instante preciso en el que el colapso hacia sustrato o hacia producto es igualmente probable. La diferencia entre los niveles de energía del estado basal y del estado de transición se denomina **energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$.** La velocidad de una reacción refleja esta energía de activación: a una energía de activación más elevada corresponde una reacción más lenta. Las velocidades de reacción pueden aumentarse incrementando la temperatura y/o la presión, mediante las que se aumenta el número de moléculas con energía suficiente para superar la barrera energética. De modo alternativo, es posible disminuir la energía de activación añadiendo un catalizador **(Fig. 6–3).** *La catálisis aumenta las velocidades de reacción disminuyendo las energías de activación.*

Los enzimas no constituyen una excepción a la regla de que los catalizadores no modifican el equilibrio de reacción. Las flechas bidireccionales de la ecuación 6–1 ilustran este punto: cualquier enzima que catalice la reacción S → P también cataliza la reacción P → S. Su única misión es *acelerar* la interconversión de S y P. No se gasta enzima en el proceso y el punto de equilibrio no queda afectado. No obstante, la reacción alcanza el equilibrio de una manera mucho más rápida cuando se halla presente el enzima adecuado ya que incrementa la velocidad de la reacción.

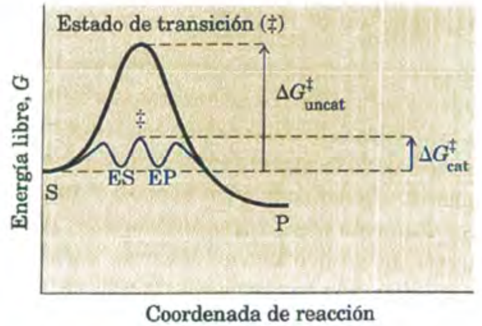


FIGURA 6–3 Diagrama de coordenada de reacción en la que se comparan las reacciones catalizada por enzima y sin catalizar. En la reacción S → P, los intermedios ES y EP ocupan mínimos en la curva de progreso energético de la reacción catalizada enzimáticamente. Los términos $\Delta G^{\ddagger}_{uncat}$ y $\Delta G^{\ddagger}_{cat}$ corresponden a las energías de activación de las reacciones sin catalizar y catalizada, respectivamente. La energía de activación del proceso global es menor cuando el enzima cataliza la reacción.

Se puede ilustrar este principio general considerando la reacción de la sacarosa con el oxígeno para formar dióxido de carbono y agua:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 12O_2 \rightleftharpoons 12CO_2 + 11H_2O$$

Esta transformación, que se realiza a través de una serie de reacciones separadas, tiene una $\Delta G'^{\circ}$ muy grande y negativa, por lo que la cantidad de sacarosa presente en el equilibrio es despreciable. No obstante, la sacarosa es un compuesto estable ya que la barrera de activación energética que debe superar antes de reaccionar con el oxígeno es muy alta. La sacarosa puede almacenarse en un recipiente en presencia de oxígeno de manera casi indefinida sin que reaccionen. Sin embargo, en las células la sacarosa es degradada a CO_2 y H_2O a través de una serie de reacciones catalizada por enzimas. Estos enzimas no sólo aceleran las reacciones sino que las organizan y controlan de tal manera que gran parte de la energía liberada en este proceso se recupera en otras formas asequibles a la célula para que realice sus funciones. La ruta de reacciones mediante las que la sacarosa (y otros azúcares) se degradan es la ruta primaria de formación de energía para las células, y los enzimas de esta ruta permiten que la secuencia de reacciones tenga lugar en una escala de tiempo útil.

Cualquier reacción puede consistir en varias etapas que suponen la formación y desintegración de especies químicas transitorias denominadas **intermedios de reacción.*** Un intermedio de reacción es cualquier especie producida en el transcurso de la reacción que tenga un tiempo de vida químico finito (y mayor que el de una vibración molecular, ~10^{-13} segundos). Cuando la reacción $S \rightleftharpoons P$ está catalizada por un enzima, los complejos ES y EP pueden ser considerados intermedios a pesar de que S y P sean especies químicas estables (Ec. 6–1); los complejos ES y EP ocupan valles en el diagrama de la coordenada de reacción (Fig. 6–3). En el curso de una reacción catalizada enzimáticamente suelen existir otros intermedios químicos adicionales y menos estables. La interconversión de dos intermedios de reacción secuenciales constituye, por tanto, un paso de la reacción. Cuando en una reacción existen varios pasos, la velocidad global viene determinada por el paso (o pasos) cuya energía de activación es la más elevada; este paso se denomina **paso limitante de velocidad.** En un caso sencillo, el paso limitante de velocidad es el punto de energía más elevado en el diagrama de interconversión de S y P. En la práctica, el paso limitante de velocidad puede cambiar con las condiciones de reacción y en el caso de muchos enzimas puede haber varios pasos con energías de activación similares, lo que significa que todos ellos son parcialmente limitantes de la velocidad.

Las energías de activación son barreras energéticas para las reacciones químicas. Estas barreras son cruciales para la propia vida. La velocidad a la que una molécula se transforma en una reacción química determinada desciende al aumentar la

* En este capítulo los términos *paso* e *intermedio* se refieren a especies químicas que se originan en una reacción catalizada por un único enzima. En el contexto de las rutas metabólicas en las que participan múltiples enzimas (Parte II de este libro), estos términos se utilizan de manera algo diferente. Una reacción enzimática completa recibe a menudo el nombre de "paso" de una ruta y el producto de la reacción de un enzima (que es el sustrato para el siguiente enzima de la ruta) se suele denominar "intermedio" o "intermediario".

barrera de activación de esta reacción. Sin estas barreras energéticas, las macromoléculas complejas revertirían espontáneamente a formas moleculares mucho más sencillas y no podrían existir ni las estructuras complejas y altamente ordenadas ni los procesos metabólicos que tienen lugar en las células. Los enzimas han evolucionado para disminuir *selectivamente* las energías de activación de las reacciones necesarias para la supervivencia celular.

Las velocidades de reacción y los equilibrios tienen definiciones termodinámicas precisas

Los *equilibrios* de reacción están unidos inextricablemente a la variación de energía libre estándar de la reacción, $\Delta G'^{\circ}$, mientras que las *velocidades* de reacción están unidas a la energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$. Una introducción básica a estas relaciones termodinámicas constituye el próximo paso para saber cómo funcionan los enzimas.

Un equilibrio tal como $S \rightleftharpoons P$ viene descrito por una **constante de equilibrio, K_{eq},** o simplemente K (p. 24). En las condiciones estándar utilizadas para comparar los procesos bioquímicos, una constante de equilibrio se denota por K'_{eq} (o K'):

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \qquad (6\text{–}2)$$

Partiendo de la termodinámica, puede describirse la relación entre K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$ mediante la expresión

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq} \qquad (6\text{–}3)$$

donde R es la constante de los gases (8,315 J/mol·K) y T es la temperatura absoluta 298 K (25 °C). La ecuación 6–3 se desarrollará y discutirá detalladamente en el Capítulo 13. Aquí el punto importante es que la constante de equilibrio está relacionada directamente con el cambio de energía libre estándar global de la reacción (Tabla 6–4). Un valor negativo grande de $\Delta G'^{\circ}$ refleja un equilibrio de reacción favorable aunque, tal como se ha comentado antes, esto no significa que la reacción transcurra a una velocidad elevada.

TABLA 6–4 Relación entre K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)
10^{-6}	34,2
10^{-5}	28,5
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,1
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0,0
10^{1}	−5,7
10^{2}	−11,4
10^{3}	−17,1

Nota: La relación se calcula a partir de $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$ (Ec. 6-3).

La velocidad de una reacción viene determinada por la concentración de reactivo (o reactivos) y por una **constante de velocidad** generalmente representada por el símbolo k. Para la reacción unimolecular $S \rightarrow P$, la velocidad de la reacción, V, que representa la cantidad de S que ha reaccionado por unidad de tiempo, viene expresada por una **ecuación de velocidad**:

$$V = k[S] \qquad (6\text{–}4)$$

En esta reacción, la velocidad sólo depende de la concentración de S. Es lo que se denomina una reacción de primer orden. El factor k es una constante de proporcionalidad que refleja la probabilidad de reacción bajo un conjunto de condiciones (pH, temperatura, etc.). Aquí, k es una constante de velocidad de primer orden y sus unidades son tiempos inversos, como por ejemplo s^{-1}. Si una reacción de primer orden tiene una constante de velocidad k de 0,03 s^{-1} se puede interpretar (cualitativamente) que 3% de sustrato asequible será convertido en P en 1 s. Una reacción con una constante de velocidad de 2.000 s^{-1} estará lista en una pequeña fracción de segundo. Si una velocidad de reacción depende de la concentración de dos compuestos diferentes, o si reaccionan dos moléculas del mismo compuesto, la reacción es de segundo orden y k es una constante de velocidad de segundo orden (con unidades $M^{-1}s^{-1}$). La ecuación de la velocidad tiene entonces la forma

$$V = k[S_1][S_2] \qquad (6\text{–}5)$$

Aplicando la teoría del estado de transición se puede deducir una expresión que relaciona la magnitud de la constante de velocidad con la energía de activación:

$$k = \frac{\mathbf{k}T}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT} \qquad (6\text{–}6)$$

donde $\mathbf{k}$ es la constante de Boltzmann y h es la constante de Planck. El punto importante es que esta relación entre la constante de velocidad k y la energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$, es inversa y exponencial. En forma simplificada ésta es la base de la afirmación de que una energía de activación menor significa una velocidad de reacción mayor.

A continuación variamos el enfoque desde lo que *hacen* los enzimas a *cómo* lo hacen.

Unos pocos principios explican el poder catalítico y la especificidad de los enzimas

Los enzimas son catalizadores extraordinarios. Los aumentos de velocidad conseguidos por los enzimas son de 5 a 17 órdenes de magnitud (Tabla 6–5). Los enzimas son también muy específicos, discriminando fácilmente entre sustratos con estructuras muy similares. ¿Cómo se pueden explicar estos incrementos enormes y altamente selectivos en su velocidad? ¿De dónde viene la energía que proporciona un descenso espectacular de las energías de activación de reacciones específicas?

La respuesta a estas preguntas tiene dos partes distintas pero relacionadas. La primera se basa en las reordenaciones de los enlaces covalentes durante una reacción catalizada por un enzima. Entre sustratos y grupos funcionales de los enzimas (cadenas laterales específicas de aminoácidos, iones metálicos y coenzimas) tienen lugar reacciones químicas de muchos tipos. Los grupos funcionales catalíticos de los enzimas pueden for-

TABLA 6–5	Algunos incrementos de velocidad producidos por los enzimas
Ciclofilina	10^5
Carbónico anhidrasa	10^7
Triosa fosfato isomerasa	10^9
Carboxipeptidasa A	10^{11}
Fosfoglucomutasa	10^{12}
Succinil-CoA transferasa	10^{13}
Ureasa	10^{14}
Oritidina monofosfato descarboxilasa	10^{17}

mar enlaces covalentes transitorios con un sustrato, activándolo para la reacción, o bien puede transferirse transitoriamente un grupo del sustrato al enzima. En muchos casos, estas reacciones sólo tienen lugar en el sitio activo del enzima. Las interacciones covalentes entre enzimas y sustratos hacen disminuir la energía de activación (por lo que aceleran la reacción), proporcionando un camino de reacción alternativo y de menor energía. En la Sección 6.4 se describen diversos tipos específicos de reestructuraciones en reacciones enzimáticas.

La segunda parte de la explicación se basa en las interacciones *no covalentes* entre el enzima y el sustrato. Gran parte de la energía requerida para disminuir la energía de activación procede generalmente de interacciones débiles no covalentes entre el sustrato y el enzima. El factor que diferencia realmente a los enzimas de la mayoría de catalizadores no enzimáticos es la formación de un complejo ES específico. La interacción entre enzima y sustrato en este complejo está mediada por las mismas fuerzas que estabilizan la estructura proteica, entre ellas puentes de hidrógeno e interacciones iónicas e hidrofóbicas (Capítulo 4). El establecimiento de cada interacción débil en el complejo ES viene acompañado por la liberación de una pequeña cantidad de energía libre que estabiliza la interacción. La energía procedente de la interacción enzima–sustrato se denomina **energía de fijación, ΔG_B.** Su significado se extiende más allá del de una simple estabilización de la interacción enzima–sustrato. *La energía de fijación es la principal fuente de energía libre utilizada por los enzimas para disminuir la energía de activación de las reacciones.*

Hay dos principios fundamentales que están interrelacionados y que proporcionan una explicación general de cómo los enzimas aprovechan la energía de unión no covalente.

1. La mayor parte del poder catalítico de los enzimas procede en último término de la energía libre liberada al formarse los múltiples enlaces débiles e interacciones entre un enzima y su sustrato. Esta energía de fijación contribuye tanto a la especificidad como a la catálisis.

2. Las interacciones débiles están optimizadas en el estado de transición de la reacción; los sitios activos de los enzimas son complementarios no a los sustratos, sino a los estados de transición a través de los que pasan los sustratos al ser convertidos en productos durante una reacción.

Estos temas son vitales para la comprensión de los enzimas y pasan a ser ahora el foco principal de interés de este capítulo.

Las interacciones débiles entre enzima y sustrato son óptimas en el estado de transición

¿Cómo utiliza un enzima la energía de fijación para disminuir la energía de activación de la reacción? La formación del complejo ES no es por sí misma la explicación por bien que algunas de las primeras consideraciones sobre los mecanismos de reacción empezaron con esta idea. Estudios sobre la especificidad enzimática llevados a cabo por Emil Fischer le llevaron a proponer, en 1894, que los enzimas eran estructuralmente complementarios a sus sustratos, de modo que se acoplaban del mismo modo que una llave y una cerradura **(Fig. 6–4)**. Esta elegante idea de que una interacción específica (exclusiva) entre dos moléculas biológicas está facilitada por superficies moleculares con formas complementarias, ha influido profundamente en el desarrollo de la bioquímica y se encuentra en el centro de muchos procesos bioquímicos. No obstante, la hipótesis de la "llave y cerradura" puede ser engañosa cuando se aplica a la catálisis enzimática. Un enzima totalmente complementario a su sustrato sería un enzima muy deficiente, como podemos demostrar.

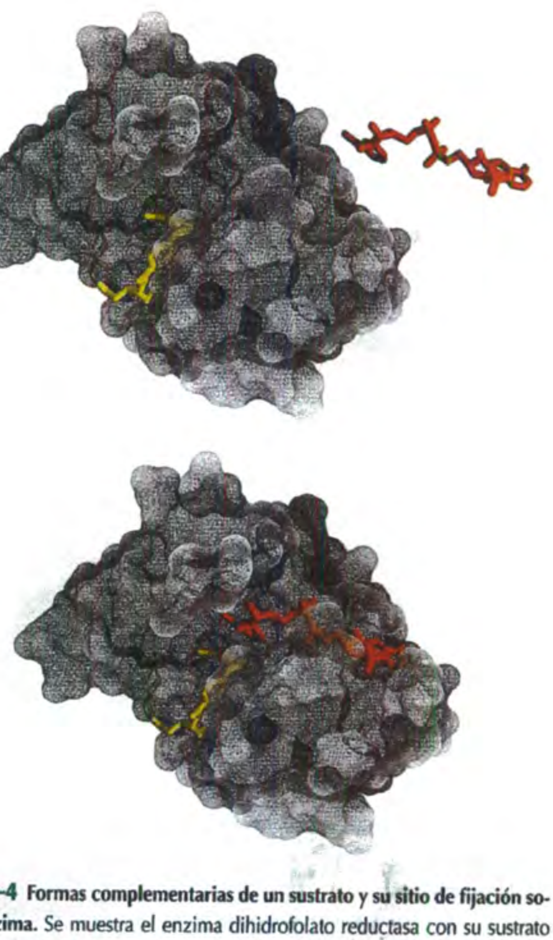


FIGURA 6–4 Formas complementarias de un sustrato y su sitio de fijación sobre un enzima. Se muestra el enzima dihidrofolato reductasa con su sustrato NADP⁺ (rojo), sin fijar (parte superior) y fijado (parte inferior). También es visible otro sustrato unido, el tetrahidrofolato (amarillo) (PDB ID 1RA2). En este modelo el NADP⁺ se fija a una bolsa que le es complementaria en forma y propiedades iónicas, una ilustración de la hipótesis de "llave y cerradura" de Emil Fischer. En realidad, la complementariedad entre la proteína y el ligando (en este caso el sustrato) raras veces es perfecta, tal como hemos visto en el Capítulo 5.

Consideremos una reacción imaginaria, la rotura de una vara metálica magnética. La reacción no catalizada se muestra en la **Figura 6–5a**. Examinemos ahora dos enzimas imaginarios (dos "varasas") que pudieran catalizar esta reacción, utilizando en ambos casos fuerzas magnéticas como ejemplo de la energía de fijación utilizada por los enzimas reales. Diseñemos en primer lugar un enzima perfectamente complementario al sustrato (Fig. 6–5b). El sitio activo de esta varasa es una bolsa forrada con imanes. Para que se dé la reacción (rotura), la vara debe alcanzar el estado de transición de la reacción, pero la vara se fija de manera tan fuerte al sitio activo que no puede doblarse, ya que la curvatura de la vara eliminaría algunas de las interacciones magnéticas entre la vara y el enzima. Un enzima así *impide* la reacción ya que lo que hace es estabilizar el sustrato. En un diagrama de la coordenada de reacción (Fig. 6–5b), este tipo de complejo ES correspondería a un pozo energético del que le sería muy difícil salir al sustrato. Tal enzima no tendría ninguna utilidad.

La noción moderna de la catálisis enzimática, propuesta primeramente por Michael Polanyi (1921) y por Haldane (1930) y después elaborada por Linus Pauling en 1946 dice: para que un enzima catalice una reacción ha de ser complementario al *estado de transición de la reacción*. Ello significa que las interacciones óptimas entre sustrato y enzima sólo pueden tener lugar en el estado de transición. La Figura 6–5c demuestra de qué modo puede actuar un enzima de este tipo. La vara de metal se fija a la varasa, pero sólo se utilizan unas cuantas interacciones para formar el complejo ES. El sustrato ligado aún ha de experimentar el aumento de energía libre necesario para alcanzar el estado de transición. Ahora, sin embargo, el incremento de energía libre requerido para llevar la vara a una conformación curva y parcialmente partida queda nivelado, o es "pagado", por las interacciones magnéticas (energía de fijación) que se forman entre el enzima y el sustrato en el estado de transición. Muchas de estas interacciones se dan en partes de la vara distantes del punto de rotura; así, las interacciones entre el enzima y partes no reactivas del sustrato proporcionan una cierta cantidad de la energía necesaria para catalizar su rotura. Esta "factura energética" se traduce en una energía de activación neta inferior y una mayor velocidad de reacción.

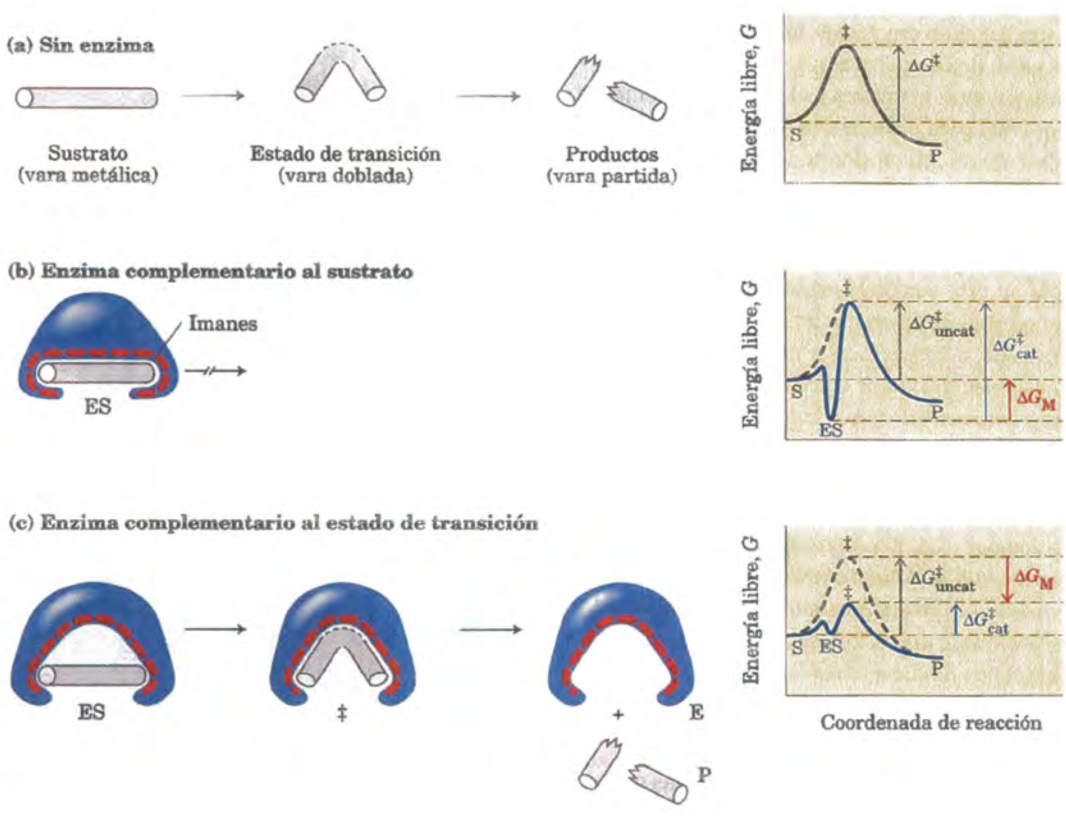


FIGURA 6–5 Enzima imaginario (varasa) diseñado para catalizar la rotura de una vara metálica. **(a)** Para que se rompa la vara en preciso doblarla en primer lugar (estado de transición). En ambos ejemplo de "varasa", las interacciones magnéticas ocupan el lugar de las interacciones por enlaces débiles entre enzima y sustrato. **(b)** Una varasa con una bolsa forrada con imanes complementaria en su estructura a la vara (sustrato), la estabiliza. El doblamiento estará impedido por la atracción magnética entre la vara y la varasa. **(c)** Un enzima con una bolsa complementaria al estado de transición de la reacción ayudará a desestabilizar la vara dando lugar a la catálisis de la reacción. Las interacciones magnéticas proporcionan energía que compensa el incremento de energía libre requerido para doblar la vara. Los diagramas de la coordenada de reacción (derecha) muestran las consecuencias energéticas de la complementariedad con el sustrato frente a la complementariedad con el estado de transición (se han omitido los complejos EP). El término ΔG_M, la diferencia entre las energías del estado de transición de las reacciones no catalizada y catalizada, procede de las interacciones magnéticas entre la vara y la varasa. Cuando el enzima es complementario al sustrato **(b)**, el complejo ES es más estable y tiene menos energía libre en el estado basal que el sustrato solo. El resultado es un *incremento* de la energía de activación.

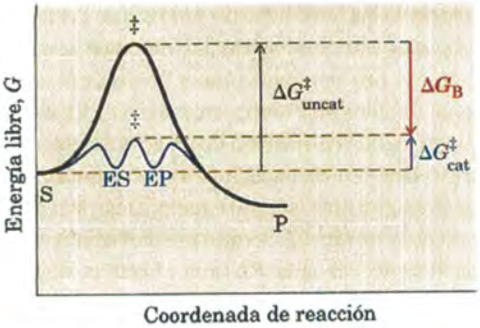


FIGURA 6–6 Papel de la energía de fijación en la catálisis. Para disminuir la energía de activación de una reacción el sistema ha de adquirir una cantidad de energía equivalente a la cantidad en que disminuye $\Delta G^{\ddagger}$. Gran parte de esta energía proviene mayoritariamente de la energía de fijación (ΔG_B) conseguida en la formación de interacciones no covalentes débiles entre sustrato y enzima en el estado de transición. El papel de ΔG_B es análogo al de ΔG_M en la Fig. 6–5.

Los enzimas reales funcionan según un principio análogo. En el complejo ES se forman algunas interacciones débiles, pero el complemento total de las interacciones débiles posibles entre sustrato y enzima sólo se forman cuando el sustrato alcanza el estado de transición. La energía libre (energía de fijación) liberada por la formación de esas interacciones equilibra parcialmente la energía requerida para llegar a la cima de la colina energética. La suma de la energía de activación desfavorable (positiva) $\Delta G^{\ddagger}$ y la energía de fijación ΔG_B favorable (negativa) da como resultado una energía de activación *neta* menor **(Fig. 6–6)**. El estado de transición tampoco es una especie estable en el enzima, sino que representa un punto breve en el tiempo que pasa un sustrato en la cima de la colina energética. Sin embargo, la reacción catalizada por el enzima es mucho más rápida que el proceso sin catalizar, porque la colina es mucho más baja. El principio importante subyacente es que *las interacciones de fijación débiles entre el enzima y el sustrato proporcionan una fuerza motriz sustancial para la catálisis enzimática*. Los grupos del sustrato que intervienen en estas interacciones débiles pueden estar situados a cierta distancia de los enlaces que se rompen o modifican. Las interacciones débiles formadas únicamente en el estado de transición son las que contribuyen de modo principal a la catálisis.

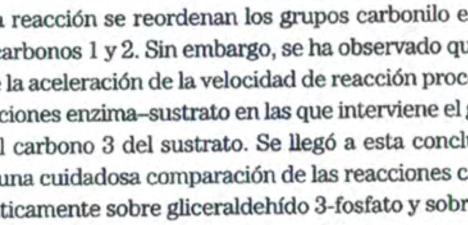
La necesidad de múltiples interacciones débiles para impulsar la catálisis es una de las razones de que los enzimas (y algunos coenzimas) sean tan grandes. Un enzima ha de aportar grupos funcionales para interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno y otras interacciones y ha de posicionar estos grupos de forma precisa para que la energía de fijación en el estado de transición sea óptima. Se obtendrá una correcta fijación si el sustrato se ubica en una cavidad (el sitio activo) donde se encuentre alejado del agua de forma efectiva. El tamaño de las proteínas refleja la necesidad de la existencia de superestructuras que permitan mantener la interacción de grupos correctamente posicionados y que mantengan al mismo tiempo inalterable la cavidad del sitio activo.

La energía de fijación contribuye a la especificidad de reacción y a la catálisis

¿Pueden explicarse cuantitativamente las enormes aceleraciones de velocidad conseguidas por los enzimas en base a la energía de fijación? Sí. Como punto de referencia, la Ecuación 6–6 nos permite calcular que $\Delta G^{\ddagger}$ debe disminuir unos 5,7 kJ/mol para acelerar una reacción de primer orden en un factor de 10, en las condiciones que se encuentran normalmente en las células. La energía disponible a partir de la formación de una sola interacción débil se calcula generalmente entre 4 y 30 kJ/mol. La energía global disponible a partir de varias interacciones de este tipo es, por tanto, suficiente para hacer disminuir las energías de activación los 60 a 100 kJ/mol requeridos para explicar los grandes aumentos de velocidad observados en muchos enzimas.

La misma energía de fijación que aporta energía para la catálisis también hace que el enzima sea específico. La **especificidad** se refiere a la capacidad de un enzima de discriminar entre un sustrato y una molécula competitiva. Conceptualmente, la especificidad es fácil de distinguir de la catálisis. No obstante, la catálisis y la especificidad son mucho más difíciles de diferenciar experimentalmente porque surgen del mismo fenómeno. Si el sitio activo de un enzima tiene grupos funcionales ordenados de manera óptima para formar una serie de interacciones débiles con un sustrato determinado en el estado de transición, el enzima no podrá interaccionar tan bien con ningún otro sustrato. Por ejemplo, si el sustrato tiene un grupo hidroxilo que forma un puente de hidrógeno específico con un residuo Glu del enzima, cualquier molécula que carezca de este grupo hidroxilo concreto será, en general, un peor sustrato para el enzima. Además, cualquier molécula con un grupo funcional extra para el que el enzima no contiene una bolsa o sitio de fijación será muy probablemente excluida del enzima. En general, la *especificidad* proviene de la formación de múltiples interacciones débiles entre el enzima y su molécula de sustrato específica.

Es posible demostrar la importancia de la energía de fijación en la catálisis. Por ejemplo, el enzima glucolítico triosa fosfato isomerasa cataliza la interconversión entre el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato:



En esta reacción se reordenan los grupos carbonilo e hidroxilo de los carbonos 1 y 2. Sin embargo, se ha observado que más del 80% de la aceleración de la velocidad de reacción procede de las interacciones enzima–sustrato en las que interviene el grupo fosfato del carbono 3 del sustrato. Se llegó a esta conclusión mediante una cuidadosa comparación de las reacciones catalizadas enzimáticamente sobre gliceraldehído 3-fosfato y sobre gliceraldehído (sin grupo fosfato en la posición 3) como sustratos.

Los principios generales antes esbozados se pueden ilustrar mediante diversos mecanismos catalíticos reconocidos. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, por lo que un enzima determinado puede incorporar varios en su propio mecanismo de acción global.

Consideremos lo que se necesita para que una reacción tenga lugar. Entre los factores físicos y termodinámicos principales que contribuyen al valor de $\Delta G^{\ddagger}$, la barrera para una reac-

ción se podrían incluir: (1) la entropía (libertad de movimiento) de las moléculas en disolución, que reduce la posibilidad de que reaccionen entre ellas; (2) la capa de solvatación del agua unida por puentes de hidrógeno que rodea y ayuda a estabilizar muchas biomoléculas en disolución acuosa; (3) la distorsión de los sustratos que ha de tener lugar en muchas reacciones, y (4) la necesidad de conseguir un alineamiento adecuado de los grupos funcionales catalíticos en el enzima. Se puede utilizar la energía de fijación para superar todas estas barreras.

En primer lugar, una gran restricción en los movimientos relativos de los dos sustratos que han de reaccionar, o **reducción de entropía,** es uno de los beneficios obvios de su fijación al enzima. La energía de fijación mantiene los sustratos en la orientación correcta para reaccionar, lo que es una contribución muy importante a la catálisis ya que las colisiones productivas entre moléculas en disolución pueden ser extremadamente raras. Los sustratos se pueden alinear sobre el enzima de forma precisa, generando un gran número de interacciones débiles entre ellos y grupos localizados de manera estratégica en el enzima, lo que mantiene las moléculas de sustrato en las posiciones adecuadas. Algunos estudios han demostrado que la restricción del movimiento de dos reactivos puede producir incrementos de velocidad de muchos órdenes de magnitud (**Fig. 6–7**).

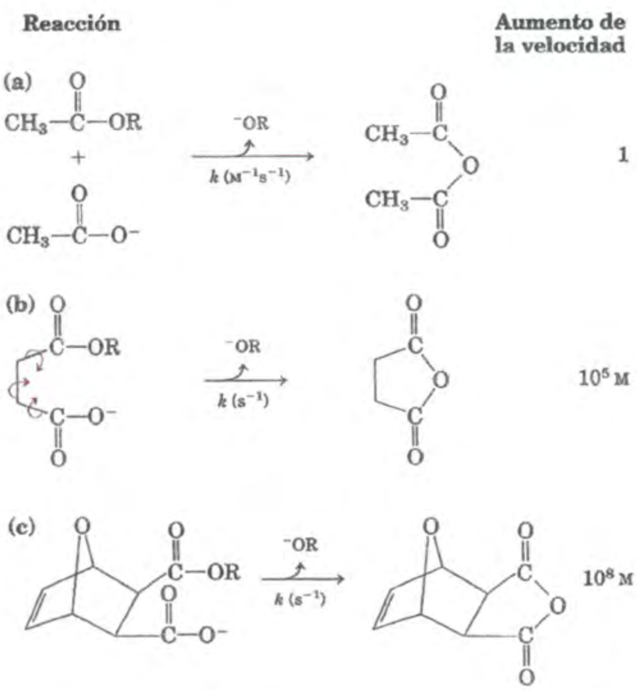


FIGURA 6–7 Aumento de la velocidad por reducción de la entropía. Se muestran las reacciones de un éster con un grupo carboxilato para formar un anhídrido. El grupo R es el mismo en todos los casos. **(a)** Para esta reacción bimolecular la constante de reacción *k* es de segundo orden y tiene como unidades $M^{-1}\ s^{-1}$. **(b)** Cuando los dos grupos reaccionantes forman parte de la misma molécula y, por tanto, tienen menos libertad de movimiento, la reacción es mucho más rápida. Para esta reacción unimolecular *k* tiene como unidades s^{-1}. Dividiendo la constante de velocidad de **(b)** por la constante de velocidad de **(a)** se obtiene un incremento de velocidad de 10^5 M. (El incremento tiene unidades de molaridad porque comparamos una reacción unimolecular con una bimolecular.) En otras palabras, si el reactivo en **(b)** estuviera presente a una concentración 1 M, los grupos reactivos se *comportarían* como si estuvieran presentes a una concentración de 10^5 M. Obsérvese que el reactivo en **(b)** tiene libertad de rotación alrededor de tres enlaces (flechas curvadas), pero a pesar de esto la reducción de la entropía en relación con **(a)** es todavía sustancial. Si los enlaces que rotan en **(b)** están restringidos como en **(c)**, la entropía disminuye aún más y la reacción muestra un incremento de velocidad de 10^8 M en relación con **(a)**.

En segundo lugar, la formación de enlaces débiles entre enzima y sustrato también da lugar a la **desolvatación** del sustrato. Interacciones enzima–sustrato reemplazan la mayoría de, o todos, los enlaces de hidrógeno que puedan existir en disolución entre el sustrato y el agua. En tercer lugar, la energía de fijación correspondiente a las interacciones débiles formadas únicamente durante el estado de transición de la reacción ayuda a compensar termodinámicamente cualquier distorsión, principalmente en forma de redistribución electrónica, que debe experimentar el sustrato para reaccionar.

Finalmente, el propio enzima puede experimentar un cambio en la conformación cuando se fija el sustrato, también inducido por múltiples interacciones débiles con el sustrato. Esta situación se conoce como **encaje inducido,** un mecanismo postulado por Daniel Koshland en 1958. Los movimientos pueden afectar a una pequeña zona del enzima cerca del sitio activo o implicar cambios en la posición de dominios enteros. Normalmente se genera una red de movimientos acoplados en todo el enzima que da lugar a los cambios necesarios en el sitio activo. El encaje inducido puede servir para disponer grupos funcionales específicos del enzima en la orientación adecuada para catalizar la reacción. El cambio de conformación también permite la formación de interacciones débiles adicionales en el estado de transición. En cualquier caso, la nueva conformación del enzima ha incrementado sus propiedades catalíticas. Como ya hemos visto (Capítulo 5), el encaje inducido es una característica usual en la unión reversible de los ligandos a las proteínas. El encaje inducido también es importante en la interacción de casi todos los enzimas con sus sustratos.

Grupos catalíticos específicos contribuyen a la catálisis

En la mayoría de enzimas, la energía de fijación utilizada para formar el complejo ES es sólo una de las diversas contribuciones al mecanismo catalítico general. Una vez unido el sustrato al enzima, grupos funcionales catalíticos situados adecuadamente colaboran en la rotura o formación de enlaces mediante diversos mecanismos entre los que se encuentran la catálisis ácido–base general, la catálisis covalente y la catálisis por iones metálicos. Estos mecanismos son diferentes de los basados en la energía de fijación porque generalmente suponen una interacción *covalente* transitoria con un sustrato, o la transferencia de grupos desde o hacia un sustrato.

Catálisis ácido-base general Muchas reacciones bioquímicas suponen la formación de intermedios cargados inestables que tienden a descomponerse rápidamente en sus especies reactivas constituyentes, impidiendo así la reacción (**Fig. 6–8**). Los intermedios cargados se pueden estabilizar a menudo transfiriendo protones a o desde el sustrato o intermedio para formar una especie que se descompone más fácilmente en productos. En las reacciones no enzimáticas, las transferencias de protones pueden utilizar sólo los constituyentes del agua u otros dadores o aceptores débiles de protones. La catálisis que sólo utiliza los iones H^+ (H_3O^+) u OH^- presentes en el agua se denomina **catálisis ácida**

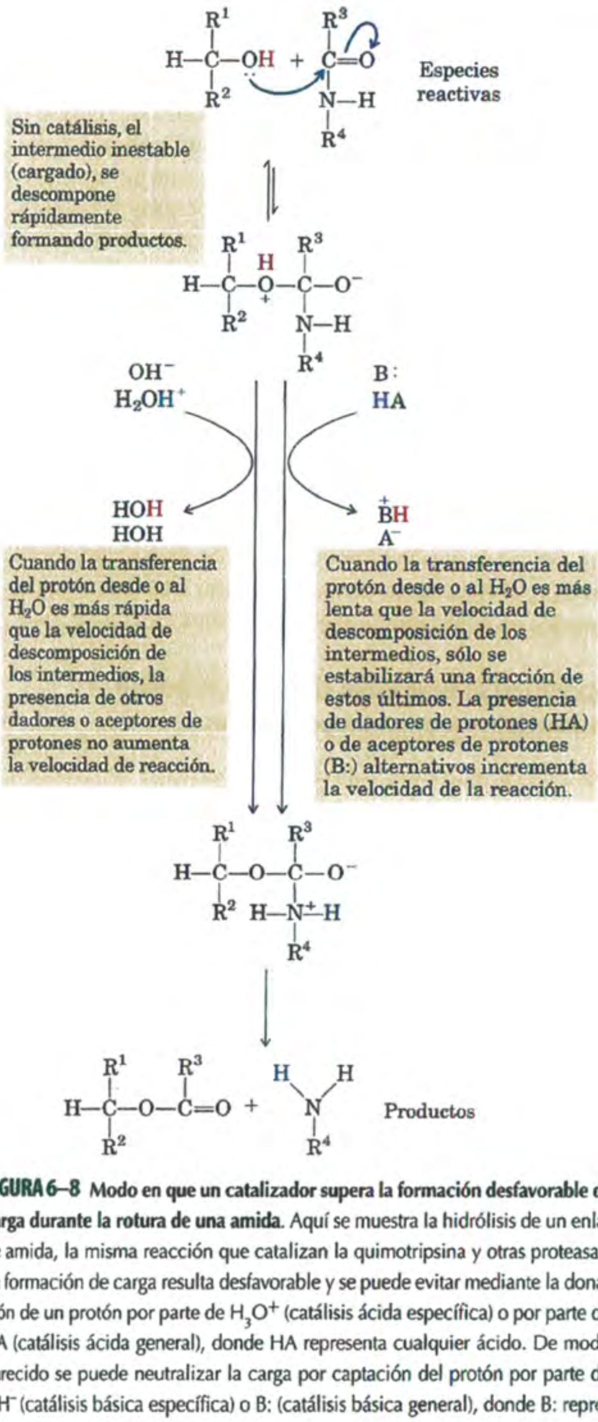


FIGURA 6–8 Modo en que un catalizador supera la formación desfavorable de carga durante la rotura de una amida. Aquí se muestra la hidrólisis de un enlace amida, la misma reacción que catalizan la quimotripsina y otras proteasas. La formación de carga resulta desfavorable y se puede evitar mediante la donación de un protón por parte de H_3O^+ (catálisis ácida específica) o por parte de HA (catálisis ácida general), donde HA representa cualquier ácido. De modo parecido se puede neutralizar la carga por captación del protón por parte de OH^- (catálisis básica específica) o B: (catálisis básica general), donde B: representa cualquier base.

o básica específica. Si la transferencia de protones entre el intermedio y el agua es más rápida que la descomposición del intermedio en reactivos, el intermedio se estabilizará de manera efectiva cada vez que se forma. En este caso no se producirá catálisis adicional facilitada por otros aceptores o dadores de protones. No obstante, en muchos casos el agua no es suficiente. El término **catálisis ácido-base general** se refiere a transferencias de protones facilitadas por otras clases de moléculas. En reacciones no enzimáticas en disolución acuosa, esto se observa solamente cuando la velocidad de descomposición del intermedio inestable en reactivos es mayor que la velocidad de transferencia de protones a o desde el agua. Muchos ácidos orgánicos débiles

Residuos aminoácidos	Forma ácida general (dador de protones)	Forma básica general (aceptor de protones)
Glu, Asp	R—COOH	R—COO⁻
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}H_3$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	R—SH	R—S⁻
His	R—C=CH / HN, NH⁺ / C—H (imidazolio)	R—C=CH / HN, N: / C—H (imidazol)
Ser	R—OH	R—O⁻
Tyr	R—C₆H₄—OH	R—C₆H₄—O⁻

FIGURA 6–9 Aminoácidos involucrados en la catálisis ácido-base general. Muchas reacciones orgánicas están favorecidas por dadores de protones (ácidos generales) o aceptores de protones (bases generales). Los sitios activos de algunos enzimas contienen grupos funcionales de aminoácidos, que pueden participar en el proceso catalítico como dadores o aceptores de protones.

pueden suplementar al agua como dadores de protones en esta situación, del mismo modo que bases orgánicas débiles pueden servir como aceptores de protones.

Varias cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar de modo similar como dadores y aceptores de protones, en el sitio activo de un enzima **(Fig. 6–9)**. Estos grupos se pueden posicionar de forma precisa en el sitio activo de un enzima para permitir la transferencia de protones, generando incrementos de velocidad del orden de 10^2 a 10^5. Este tipo de catálisis tiene lugar en la gran mayoría de los enzimas. De hecho, las transferencias de protones son las reacciones bioquímicas más habituales.

Catálisis covalente La catálisis covalente implica la formación de un enlace covalente transitorio entre el enzima y el sustrato. Consideremos la hidrólisis de un enlace entre los grupos A y B:

$$A{-}B \xrightarrow{H_2O} A + B$$

En presencia de un catalizador covalente (un enzima con un grupo nucleofílico X:) la reacción se transforma en

$$A{-}B + X{:} \longrightarrow A{-}X + B \xrightarrow{H_2O} A + X{:} + B$$

Esto altera la ruta de la reacción y *sólo* produce catálisis si la nueva ruta tiene una energía de activación inferior que la ruta no catalizada. Los dos nuevos pasos han de ser más rápidos que la reacción no catalizada. Diversas cadenas laterales de aminoácidos, entre las que se cuentan todas las de la Fig. 6–9, así como los grupos funcionales de algunos cofactores enzimáticos, sirven como nucleófilos para la formación de enlaces covalentes con los sustratos. Estos complejos covalentes siempre experimentan una reacción adicional con el fin de regenerar el enzima libre. El enlace covalente formado entre el enzima y el sustrato puede activar un sustrato para una nueva reacción de una forma que es normalmente específica para el grupo o coenzima implicado.

Catálisis por iones metálicos Los metales, tanto si están fuertemente unidos al enzima o son captados de la solución junto con el sustrato, pueden participar de diferentes maneras en la catálisis. Interacciones iónicas entre un metal fijado al enzima y el sustrato pueden ayudar a orientar a un sustrato para que reaccione o estabilizar estados de transición de la reacción que estén cargados. Esta utilización de interacciones de fijación débiles entre el metal y el sustrato es similar a algunos de los usos de la energía de fijación enzima–sustrato descrita anteriormente. Los metales también pueden facilitar reacciones de oxidación–reducción mediante cambios reversibles en el estado de oxidación del ión metálico. Casi una tercera parte de los enzimas conocidos requieren uno o más iones metálicos para su actividad catalítica.

La mayoría de enzimas utilizan una combinación de varias estrategias catalíticas para conseguir un incremento de velocidad. Un buen ejemplo de ello es la utilización de la catálisis covalente, catálisis ácido–base general y estabilización del estado de transición en la reacción catalizada por la quimotripsina, descrita con mayor detalle en la Sección 6.4.

RESUMEN 6.2 Funcionamiento de los enzimas

- Los enzimas son catalizadores muy eficientes, capaces de aumentar las velocidades de reacción en un factor de entre 10^5 y 10^{17}.
- Las reacciones catalizadas por enzimas se caracterizan por la formación de un complejo entre el sustrato y el enzima (complejo ES). La fijación del sustrato se produce en una bolsa del enzima llamada sitio activo.
- La función de los enzimas y de otros catalizadores consiste en hacer disminuir la energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$, de una reacción para incrementar su velocidad de reacción. El equilibrio de una reacción no se ve afectado por el enzima.
- Una parte significativa de la energía utilizada para el incremento de la velocidad de las reacciones enzimáticas proviene de las interacciones débiles (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones iónicas) entre enzima y sustrato. El sitio activo del enzima tiene una estructura tal que hace que algunas de estas interacciones débiles tengan lugar de modo preferente en el estado de transición de la reacción, con lo que lo estabilizan. Una de las razones del tamaño de los enzimas es la necesidad de que existan múltiples interacciones. La energía de fijación, ΔG_B, puede utilizarse para disminuir la entropía del sustrato o para producir un cambio de conformación en el enzima (encaje inducido). La energía de fijación es también la responsable de la exquisita especificidad de los enzimas por sus sustratos.
- Entre los mecanismos catalíticos adicionales empleados por los enzimas se cuentan la catálisis ácido–base general, la catálisis covalente y la catálisis por iones metálicos. La catálisis suele implicar la existencia de interacciones covalentes transitorias entre el sustrato y el enzima, o transferencias de grupos desde o al enzima, con el fin de adoptar un camino de reacción nuevo y de menor energía.

6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo

Los bioquímicos utilizan normalmente diversos métodos para estudiar el mecanismo de acción de enzimas purificados. La estructura tridimensional de la proteína proporciona información importante, que se puede completar con la obtenida por la química de proteínas clásica y por los métodos modernos de mutagénesis dirigida (el cambio de la secuencia de aminoácidos de una proteína mediante ingeniería genética; véase la Fig. 9–11). Estas tecnologías permiten a los enzimólogos examinar el papel de aminoácidos concretos en la estructura y en la acción del enzima. No obstante, el método más antiguo para estudiar mecanismos de reacción enzimáticos consiste en la determinación de la *velocidad* de la reacción y del modo en que ésta cambia en respuesta a cambios en los parámetros experimentales, una disciplina conocida como **cinética enzimática.** A continuación se expone una introducción básica a la cinética de las reacciones catalizadas por enzimas. Se pueden encontrar tratamientos más adelantados en la bibliografía que se cita al final de este capítulo.

La concentración de sustrato afecta a la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas

Uno de los factores clave que afectan la velocidad de una reacción catalizada por un enzima es la concentración de sustrato presente, [S]. Sin embargo, el estudio de los efectos de la concentración de sustrato es complicado debido al hecho de que [S] cambia durante el transcurso de una reacción in vitro a medida que el sustrato se convierte en producto. Una aproximación que sirve para simplificar los experimentos cinéticos consiste en medir la **velocidad inicial,** designada V_0 **(Fig. 6–10)**. En una reacción típica, el enzima

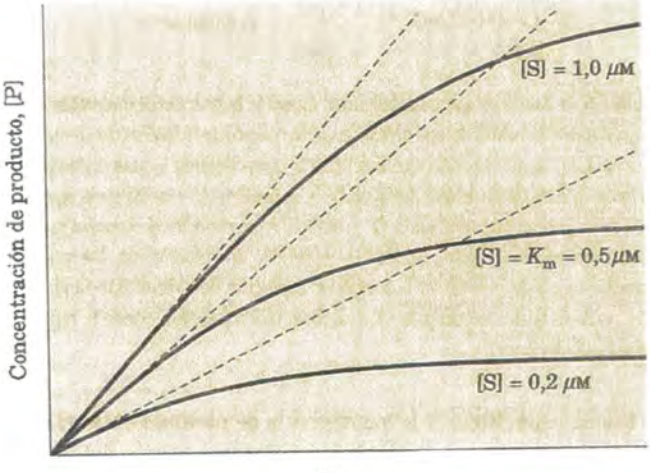


FIGURA 6–10 Velocidades iniciales de las reacciones catalizadas enzimáticamente. Un enzima hipotético cataliza la reacción S ⇌ P, y se encuentra presente a una concentración suficiente para catalizar la reacción a la velocidad máxima, V_{max}, de 1 μM/min. La constante de Michaelis K_m (explicada en el texto), es de 0,5 μM. Se muestran las curvas de progreso para concentraciones de sustrato por debajo de la K_m, del valor de la K_m y por encima del mismo. La velocidad de la reacción catalizada por el enzima desciende al irse convirtiendo el sustrato en producto. La tangente de cada curva tomada a tiempo = 0 define la velocidad inicial, V_0, de cada reacción.

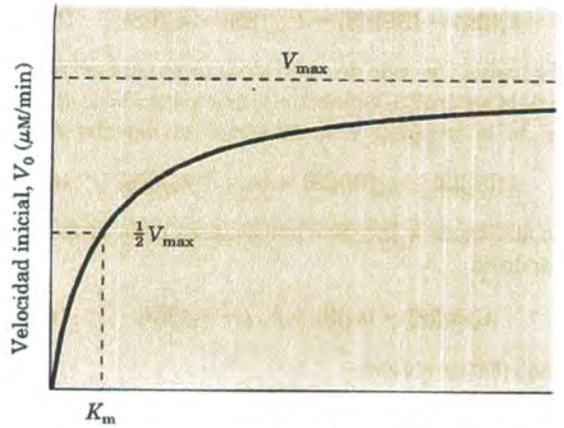


FIGURA 6–11 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por un enzima. En una gráfica de este tipo se puede obtener V_{max} por extrapolación debido a que V_0 se acercará pero nunca alcanzará V_{max}. La concentración de sustrato a la que V_0 es la mitad de la máxima es K_m, la constante de Michaelis–Menten. En un experimento de este tipo la concentración de enzima es generalmente tan baja que [S] >> [E] incluso cuando [S] se describe como baja o relativamente baja. Las unidades reseñadas son típicas de las reacciones catalizadas por enzimas y sólo se muestran aquí para ayudar a ilustrar el significado de V_0 y [S]. (Obsérvese que la curva describe parte de una hipérbola rectangular con una asíntota en V_{max}. Si se continuase la curva por debajo de [S] = 0 se aproximaría a una asíntota vertical a [S] = – K_m.)

puede estar presente en concentraciones del orden nanomolar, mientras que [S] puede ser cinco o seis órdenes de magnitud mayor. Si sólo se toman datos del inicio de la reacción (a menudo los primeros 60 segundos o menos), los cambios en [S] se limitan a un pequeño porcentaje y puede considerarse que la concentración permanece constante. A continuación puede explorarse el valor de V_0 en función de [S], valor que es ajustado por el investigador. El efecto de la variación de [S] sobre V_0 cuando se mantiene constante la concentración de enzima se muestra en la **Figura 6–11**. A concentraciones de sustrato relativamente bajas, V_0 aumenta casi linealmente con el incremento de [S]. A mayores concentraciones de sustrato, V_0 aumenta a incrementos cada vez menores en respuesta a incrementos de [S]. Finalmente, se alcanza un punto más allá del cual se dan incrementos muy pequeños de V_0 a medida que aumenta [S]. Esta meseta es la **velocidad máxima, V_{max}**.

El complejo ES constituye la clave para entender el comportamiento cinético, del mismo modo que representó un punto de partida para la discusión de la catálisis. El patrón cinético de la Figura 6–11 hizo que Victor Henri, bajo la dirección de Wurtz, propusiese en 1903 que la combinación de un enzima con su molécula de sustrato para formar el complejo ES es un paso necesario en la catálisis enzimática. Esta idea fue ampliada para dar lugar a una teoría general de la acción enzimática, en particular a cargo de Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913. Postularon que el enzima se combina en primer lugar de forma reversible con su sustrato formando un complejo enzima–sustrato en un paso reversible relativamente rápido:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (6\text{–}7)$$

El complejo ES se descompone seguidamente en un segundo paso más lento dando el enzima libre y el producto de la reacción P:

Leonor Michaelis, 1875–1949

Maud Menten, 1879–1960

$$ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (6\text{–}8)$$

Puesto que la segunda reacción (Ec. 6–8) es la más lenta y limita, por tanto, la velocidad de la reacción global, dicha velocidad global ha de ser proporcional a la concentración de la especie que reacciona en el segundo paso, es decir, ES.

En cualquier momento de una reacción catalizada por un enzima, éste existe en dos formas, la forma libre o sin combinar E y la forma combinada ES. A baja [S], la mayor parte del enzima estará en la forma sin combinar E. Aquí la velocidad será proporcional a [S] porque el equilibrio de la ecuación 6–7 será empujado hacia la formación de más ES a medida que [S] aumenta. La velocidad inicial máxima de la reacción catalizada (V_{max}) se observará cuando virtualmente todo el enzima esté en forma de complejo ES y la concentración de E sea extremadamente pequeña. En estas condiciones, el enzima está "saturado" con su sustrato de modo que el aumento adicional de [S] no tendrá efecto sobre la velocidad. Esta condición se producirá cuando [S] sea lo suficientemente alta como para que todo el enzima libre se haya convertido en la forma ES. Cuando el complejo ES se descompone dando el producto P, el enzima queda libre para catalizar la reacción con otra molécula de sustrato. El efecto de saturación es una característica distintiva de la catálisis enzimática y es el responsable de la meseta observada en la Figura 6–11. La pauta seguida en la Figura 6–11 recibe en ocasiones el nombre de cinética de saturación.

Cuando el enzima se mezcla inicialmente con un gran exceso de sustrato, existe un período inicial, denominado **estado preestacionario,** durante el cual aumenta la concentración del complejo ES. Normalmente el estado preestacionario es demasiado corto para que sea observado fácilmente y dura tan sólo unos microsegundos, por lo que no aparece en la Figura 6–10. La reacción alcanza rápidamente un **estado estacionario** en el que [ES] (y la concentración de otros intermedios) permanece aproximadamente constante con el tiempo. El concepto de estado estacionario fue presentado por G.E. Briggs y Haldane en 1925. La V_0 medida refleja generalmente el estado estacionario, aun cuando V_0 se limite a los primeros instantes de la reacción, y el análisis de las velocidades iniciales se conoce como **cinética del estado estacionario.**

La relación entre concentración de sustrato y velocidad de reacción enzimática se puede expresar cuantitativamente

La curva que representa la relación entre [S] y V_0 (Fig. 6–11) tiene la misma forma general para la mayoría de enzimas (se

acerca a una hipérbola rectangular), y se puede expresar algebraicamente mediante la ecuación de Michaelis-Menten. Estos investigadores dedujeron esta ecuación a partir de su hipótesis básica de que el paso limitante de velocidad en las reacciones enzimáticas es la descomposición del complejo ES para formar el producto y el enzima libre. La ecuación es

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}9)$$

Los términos importantes son [S], V_0, V_{max} y una constante llamada constante de Michaelis o K_m. Todos estos términos se pueden medir fácilmente de manera experimental.

Aquí desarrollaremos los pasos lógicos y algebraicos básicos para plantear una deducción moderna de la ecuación de Michaelis-Menten que asume la existencia del estado estacionario introducida por Briggs y Haldane. La deducción se inicia con las dos reacciones básicas que intervienen en la formación y descomposición de ES (Ecs. 6–7 y 6–8). En los primeros momentos de la reacción, la concentración del producto, [P], es despreciable y se contempla la simplificación de que puede ignorarse la reacción inversa P → S (descrita por k_{-2}). Esta suposición no introduce distorsiones críticas y simplifica nuestra tarea. La reacción global se reduce a

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (6\text{–}10)$$

V_0 viene determinada por la descomposición de ES para dar producto, que viene fijada por [ES]:

$$V_0 = k_2[ES] \qquad (6\text{–}11)$$

Dado que [ES] de la Ecuación 6–11 no se puede medir experimentalmente con facilidad, hemos de empezar por encontrar una expresión alternativa para este término. En primer lugar introduciremos el término [E_t] que representa la concentración total de enzima (la suma de enzima libre y enzima unido al sustrato).

El enzima libre, o no fijado, se puede representar, por tanto, como [E_t] – [ES]. Además, debido a que [S] es ordinariamente mucho mayor que [E_t], la cantidad de sustrato fijada por el enzima en cualquier momento de la reacción es despreciable comparado con la [S] total. Teniendo en cuenta estas consideraciones, los pasos siguientes nos conducirán a una expresión de V_0 en función de parámetros que se miden fácilmente.

Paso 1. Las velocidades de formación y descomposición de ES vienen determinadas por las constantes de velocidad k_1 (formación) y $k_{-1} + k_2$ (descomposición a reactivos y productos, respectivamente), según las expresiones:

$$\text{Velocidad de formación de ES} = k_1([E_t] - [ES])[S] \qquad (6\text{–}12)$$

$$\text{Velocidad de descomposición de ES} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \qquad (6\text{–}13)$$

Paso 2. Damos ahora por supuesta una importante consideración: que la velocidad inicial de reacción refleja un estado estacionario en el que [ES] es constante, es decir, la velocidad de formación de ES es igual a la velocidad de descomposición. A esto se le denomina **hipótesis del estado estacionario.** Las expresiones de las Ecuaciones 6–12 y 6–13 pueden igualarse en el estado estacionario dando:

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \qquad (6\text{–}14)$$

Paso 3. Se realiza una serie de pasos algebraicos para resolver la Ecuación 6–14 según [ES]. Se efectúa la multiplicación de la parte izquierda de la igualdad y se simplifica la derecha dando

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \qquad (6\text{–}15)$$

Sumando el término k_1[ES][S] a ambos lados de la ecuación y simplificando da

$$k_1[E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES] \qquad (6\text{–}16)$$

Despejando [ES] se obtiene:

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \qquad (6\text{–}17)$$

Esta expresión aún se puede simplificar más de forma que se combinen todas las constantes de velocidad en una expresión:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1} \qquad (6\text{–}18)$$

El término $(k_2 + k_{-1})/k_1$ se define como la **constante de Michaelis, K_m.** Sustituyéndola en la Ecuación 6–18 la expresión se simplifica a

$$[ES] = \frac{[E_t]\,[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}19)$$

Paso 4. Ahora podemos expresar V_0 en función de [ES]. Sustituyendo [ES] en la Ecuación 6–11 por el lado derecho de la ecuación 6–19, obtenemos

$$V_0 = \frac{k_2[E_t]\,[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}20)$$

Esta ecuación aún se puede simplificar más. Dado que la velocidad máxima se obtendrá cuando el enzima está saturado (es decir, cuando [ES] = [E_t]), V_{max} se puede definir como k_2[E_t]. Sustituyendo esto en la Ecuación 6–20 da la Ecuación 6–9:

$$V_0 = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

Esta es la **ecuación de Michaelis-Menten,** la **ecuación de velocidad** de una reacción catalizada enzimáticamente con un sustrato. Es una definición de la relación cuantitativa entre la velocidad inicial V_0, la velocidad máxima V_{max} y la concentración inicial de sustrato [S], todos ellos relacionados a través de la constante de Michaelis, K_m. Obsérvese que K_m tiene unidades de concentración. ¿Se ajusta esta ecuación a los hechos? Sí, podemos confirmarlo considerando las situaciones límite donde [S] es muy alta o muy baja, tal como muestra la **Figura 6–12**.

De la ecuación de Michaelis–Menten emerge una relación numérica importante en el caso especial en que V_0 es exactamente la mitad de V_{max} (Fig. 6–12). En ese caso

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}21)$$

Al dividir por V_{max} obtenemos

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}22)$$

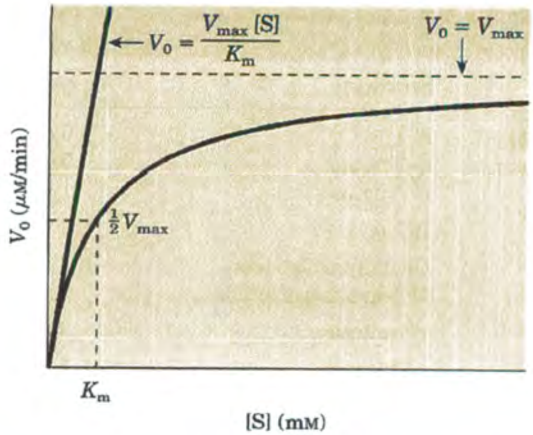


FIGURA 6–12 Dependencia de la velocidad inicial con respecto a la concentración de sustrato. En el gráfico se muestran los parámetros cinéticos que definen los límites de la curva a [S] alta y baja. A baja [S], $K_m >> [S]$, por lo que el término [S] del denominador de la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 6–9) es insignificante; la ecuación se simplifica a $V_0 = V_{max}[S]/K_m$ y V_0 depende linealmente de [S] tal como se observa. A alta [S], en donde $[S] >> K_m$, el término K_m del denominador de la ecuación de Michaelis-Menten es insignificante, simplificándose la reacción a $V_0 = V_{max}$; esto está de acuerdo con la meseta que se observa a [S] elevada. La ecuación de Michaelis-Menten es, pues, congruente con la dependencia observada de V_0 con respecto a [S], y la forma de la curva está definida por los términos V_{max}/K_m a baja [S] y V_{max} a alta [S].

Despejando K_m, obtenemos $K_m + [S] = 2[S]$, o

$$K_m = [S], \text{ cuando } V_0 = \frac{1}{2}V_{max} \qquad (6\text{–}23)$$

Ésta es una definición práctica muy útil de K_m: K_m es equivalente a la concentración de sustrato a la cual V_0 es la mitad de V_{max}.

La ecuación de Michaelis-Menten (Ec 6–9) puede transformarse algebraicamente en formas que son útiles para la determinación práctica de K_m y V_{max} (Recuadro 6–1) y, tal como describiremos más adelante, en el análisis de la acción de los inhibidores (véase el Recuadro 6–2 en la página 202).

Los parámetros cinéticos se utilizan para comparar actividades enzimáticas

Es importante distinguir entre la ecuación de Michaelis-Menten y el mecanismo cinético específico sobre el que se basó originalmente. La ecuación describe el comportamiento cinético de muchos enzimas, diciéndose de todos los enzimas que muestran una dependencia hiperbólica de V_0 frente a [S] que siguen una **cinética de Michaelis-Menten.** La regla práctica de que K_m = [S] cuando $V_0 = {}^1/_2 V_{max}$ (Ec. 6–23) es válida para todos los enzimas que siguen la cinética de Michaelis-Menten. (Las principales excepciones a la cinética de Michaelis-Menten son los enzimas re-

RECUADRO 6–1 Transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten: gráfica de los dobles recíprocos

La ecuación de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

se puede transformar algebraicamente en formas más útiles para representar los datos experimentales. Una transformación común se obtiene tomando simplemente los inversos en ambos lados de la ecuación de Michaelis-Menten, dando lugar a:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]}$$

Separando los componentes del numerador en el segundo miembro de la ecuación da

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}$$

que se simplifica a

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Esta ecuación es una transformación de la ecuación de Michaelis-Menten denominada **ecuación de Lineweaver-Burk.** Para los enzimas que obedecen la relación de Michaelis-Menten la gráfica de $1/V_0$ frente a $1/[S]$ (el "doble recíproco" de la gráfica de V_0 frente a [S] que hemos utilizado hasta este momento) da una línea recta (Fig. 1). Esta línea tiene una pendiente igual a K_m/V_{max}, la intersección sobre el eje $1/V_0$ es $1/V_{max}$ y la intersección sobre el eje $1/[S]$ es igual a $-1/K_m$. La presentación doble recíproca, también denominada de Lineweaver-Burk, tiene la gran ventaja de permitir una determinación mucho más precisa de V_{max}, la cual sólo puede ser obtenida *aproximadamente* a partir de una gráfica simple de V_0 frente [S] (véase la Fig. 6–12).

Se han deducido y utilizado otras transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten. Cada una de ellas tiene alguna ventaja al analizar los datos cinéticos enzimáticos. (Véase el Problema 14 al final del capítulo.)

La gráfica de los dobles recíprocos de las velocidades de reacción enzimáticas es muy útil para distinguir entre ciertos tipos de mecanismos de reacción enzimáticos (véase la Fig. 6–14) y analizar la inhibición enzimática (véase el Recuadro 6–2).

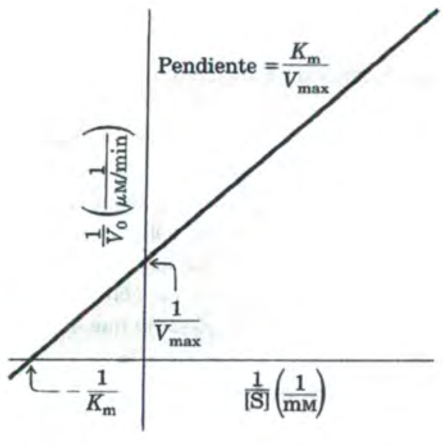


FIGURA 1 Gráfico de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk

guladores, que se discuten en la Sección 6.5.) Pero la ecuación de Michaelis-Menten no depende del mecanismo relativamente sencillo de dos pasos propuesto por Michaelis y Menten (Ec. 6–10). Muchos enzimas que siguen cinética de Michaelis-Menten tienen mecanismos de reacción muy diferentes y enzimas que catalizan reacciones con seis u ocho pasos identificables muestran, a menudo, el mismo comportamiento cinético en el estado estacionario. Aunque la ecuación 6–23 es válida para muchos enzimas, tanto la magnitud como el significado real de V_{max} y de K_m pueden cambiar de un enzima a otro. Ésta es una limitación importante de la aproximación del estado estacionario a la cinética enzimática. V_{max} y K_m son parámetros que se pueden obtener experimentalmente para cualquier enzima, pero que por sí mismos proporcionan muy poca información acerca del número, velocidad o naturaleza química de cada uno de los pasos discretos en la reacción. La cinética del estado estacionario representa, no obstante, el lenguaje estándar mediante el cual se caracterizan y comparan las eficacias catalíticas de los enzimas.

TABLA 6–6 K_m de algunos enzimas y sustratos

Enzima	Sustrato	K_m (mM)
Hexoquinasa (cerebro)	ATP	0,4
	D-Glucosa	0,05
	D-Fructosa	1,5
Carbónico anhidrasa	HCO_3^-	26
Quimotripsina	Gliciltirosinilglicina	108
	N-Benciltirosinamida	2,5
β-Galactosidasa	D-Lactosa	4,0
Treonina deshidratasa	L-Treonina	5,0

Interpretación de V_{max} y de K_m En la Figura 6–12 se muestra un método gráfico sencillo para obtener un valor aproximado de K_m. Un procedimiento más práctico, utilizando una **gráfica doble recíproca,** se presenta en el Recuadro 6–1. La K_m puede variar considerablemente de un enzima a otro, e incluso para diferentes sustratos del mismo enzima (Tabla 6–6). A veces el término se utiliza (a menudo de forma inadecuada) como una indicación de la afinidad de un enzima por su sustrato. El significado real de K_m depende de aspectos específicos del mecanismo de reacción tales como el número y velocidades relativas de los pasos individuales de la reacción. Para reacciones de dos pasos,

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \qquad (6\text{–}24)$$

Cuando k_2 es limitante de velocidad, $k_2 << k_{-1}$ por lo que K_m se simplifica a k_{-1}/k_1 que se define como **constante de disociación,** K_d, del complejo ES. Cuando se dan estas condiciones, K_m representa una medida de la afinidad del enzima por su sustrato en el complejo ES. Sin embargo, esta situación no es válida para la mayoría de enzimas. A veces, $k_2 >> k_{-1}$ por lo que $K_m = k_2/k_1$. En otros casos k_2 y k_{-1} son comparables por lo que K_m es unafunción más compleja de las tres constantes, motivo por el cual (Ec. 6–24). La ecuación de Michaelis-Menten y el comportamiento de saturación característico del enzima siguen siendo válidos, pero K_m no se puede considerar como una medida sencilla de la afinidad por el sustrato. Aún son más comunes los casos en los que la reacción transcurre a través de múltiples pasos después de la formación del complejo ES; en estas condiciones K_m es una función muy compleja de muchas constantes de velocidad.

V_{max} también varía mucho de un enzima a otro. Si un enzima reacciona según el mecanismo de Michaelis-Menten de dos pasos, $V_{max} = k_2[E_t]$ en donde k_2 es el paso limitante de velocidad. No obstante, el número de pasos en la reacción y la identidad del paso limitante de velocidad pueden variar según el enzima. Por ejemplo, consideremos la situación, bastante frecuente, en la que la liberación del producto, EP → E + P, es el paso limitante de velocidad. Al inicio de la reacción (cuando la [P]) es baja), se puede describir la reacción completa mediante el esquema

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \overset{k_3}{\rightleftharpoons} E + P \qquad (6\text{–}25)$$

En este caso, la mayor parte del enzima se encuentra en la forma EP en condiciones de saturación, con lo que $V_{max} = k_3[E_t]$. Es útil definir una constante de velocidad más general, $\boldsymbol{k_{cat}}$, **para describir la velocidad limitante de cualquier reacción enzimática en condiciones de saturación.** Si hay varios pasos en la reacción y uno de ellos es claramente limitante, k_{cat} es equivalente a la constante de velocidad del paso limitante. Para la reacción simple de la Ecuación 6–10, $k_{cat} = k_2$. Para la reacción de la Ecuación 6–25, $k_{cat} = k_3$. Cuando hay varios pasos parcialmente limitantes de velocidad, k_{cat} es una función compleja de varias constantes de velocidad que definen cada paso individual de la reacción. En la ecuación de Michaelis-Menten, $k_{cat} = V_{max}/[E_t]$, y la Ecuación 6–9 se transforma en

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{–}26)$$

La constante k_{cat} es una constante de velocidad de primer orden con unidades de tiempos inversos y recibe también el nombre de **número de recambio** (en inglés turnover number). Es equivalente al número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo y a cargo de una sola molécula de enzima cuando el enzima está saturado con el sustrato. En la Tabla 6–7 se indican los números de recambio de varios enzimas.

TABLA 6–7 Números de recambio, k_{cat}, de algunos enzimas

Enzima	Sustrato	k_{cat} (s^{-1})
Catalasa	H_2O_2	40.000.000
Carbónico anhidrasa	HCO_3^-	400.000
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	14.000
β-Lactamasa	Bencilpenicilina	2.000
Fumarasa	Fumarato	800
Proteína RecA (una ATPasa)	ATP	0,5

Comparación de mecanismos y eficiencias catalíticas Los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m son útiles para el estudio y comparación de diversos enzimas tanto si sus mecanismos de reacción son sencillos como si son complejos. Cada enzima tiene valores de k_{cat} y de K_m que reflejan el ambiente celular, la concentración de sustrato encontrada normalmente in vivo por el enzima y la química de la reacción catalizada.

Los parámetros k_{cat} y K_m también nos permiten evaluar la eficiencia cinética de los enzimas, pero para este fin no es suficiente cada uno de los parámetros por sí solos. Dos enzimas que catalizan reacciones diferentes pueden tener la misma k_{cat} (número de recambio) y, no obstante, las velocidades de las reacciones sin catalizar pueden ser bastante diferentes, con lo que los incrementos de velocidad producidos por los enzimas pueden variar mucho. De forma experimental, la K_m de un enzima tiende a ser similar a la concentración celular de su sustrato. Un enzima que actúa sobre un sustrato presente en muy baja concentración en la célula tenderá a tener una K_m inferior que un enzima que actúa sobre un sustrato que es mucho más abundante.

La mejor manera de comparar las eficiencias catalíticas de diferentes enzimas o el recambio de diferentes sustratos por el mismo enzima es mediante la comparación de la relación k_{cat}/K_m para las dos reacciones. Este parámetro, conocido a veces como **constante de especificidad,** es la constante de velocidad para la conversión de E+S a E+P. Cuando [S] << K_m, la Ecuación 6–26 se simplifica a

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}[E_t][S] \qquad (6\text{–}27)$$

En este caso V_0 depende de la concentración de dos reactivos, $[E_t]$ y [S]; por tanto, ésta es una ecuación de velocidad de segundo orden y la constante k_{cat}/K_m una constante de velocidad de segundo orden con unidades $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Existe un límite superior de k_{cat}/K_m, impuesto por la velocidad a la que E y S pueden difundir conjuntamente en una solución acuosa. Este límite controlado por difusión está entre 10^8 y 10^9 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Hay muchos enzimas que tienen un valor de k_{cat}/K_m cercano a este límite (Tabla 6–8). Se dice que estos enzimas han alcanzado la perfección catalítica. Obsérvese que valores diferentes de k_{cat} y K_m pueden dar la relación máxima.

EJEMPLO PRÁCTICO 6–1 Determinación de K_m

Experimentalmente se ha descubierto un enzima que cataliza la reacción química

$$\text{TRISTE} \rightleftharpoons \text{FELIZ}$$

Un equipo de entusiastas investigadores se dispone a estudiar el enzima, al que denominan felicidasa. Encuentran que la k_{cat} de la felicidasa es de 600 s^{-1}. Llevan a cabo diversos experimentos.

Cuando $[E_t]$ = 20 nM y [TRISTE] = 40 μM, la velocidad de reacción, V_0, es 9,6 μM s^{-1}. Calcule la K_m para el sustrato TRISTE.

Solución: Conocemos k_{cat}, $[E_t]$ y V_0. Queremos obtener K_m. La Ecuación 6–26, en la que sustituimos la V_{max} de la ecuación de Michaelis-Menten por $k_{cat}[E_t]$, nos resulta útil en este caso. Sustituyendo los valores conocidos en la Ecuación 6–26 podemos determinar K_m.

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

$$9{,}6\ \mu\text{M s}^{-1} = \frac{(600\ \text{s}^{-1})(0{,}020\ \mu\text{M})(40\ \mu\text{M})}{K_m + 40\ \mu\text{M}}$$

$$9{,}6\ \mu\text{M s}^{-1} = \frac{480\ \mu\text{M}^2\ \text{s}^{-1}}{K_m + 40\ \mu\text{M}}$$

$$9{,}6\ \mu\text{M s}^{-1}(K_m + 40\ \mu\text{M}) = 480\ \mu\text{M}^2\ \text{s}^{-1}$$

$$K_m + 40\ \mu\text{M} = \frac{480\ \mu\text{M}^2\ \text{s}^{-1}}{9{,}6\ \mu\text{M s}^{-1}}$$

$$K_m + 40\ \mu\text{M} = 50\ \mu\text{M}$$

$$K_m = 50\ \mu\text{M} - 40\ \mu\text{M}$$

$$K_m = 10\ \mu\text{M}$$

Una vez haya trabajado con esta ecuación encontrará atajos para resolver problemas como éste. Así, se puede calcular la V_{max} sabiendo que $k_{cat}[E_t] = V_{max}$ (600 s^{-1} × 0,020 μM = 12 μM s^{-1} en

TABLA 6–8 Enzimas para los que k_{cat}/K_m es próximo al límite controlado por difusión (10^8 a 10^9 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

Enzima	Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	$1{,}4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1{,}6 \times 10^8$
Carbónico anhidrasa	CO_2	1×10^6	$1{,}2 \times 10^{-2}$	$8{,}3 \times 10^7$
	HCO_3^-	4×10^5	$2{,}6 \times 10^{-2}$	$1{,}5 \times 10^7$
Catalasa	H_2O_2	4×10^7	$1{,}1 \times 10^0$	4×10^7
Crotonasa	Crotonil-CoA	$5{,}7 \times 10^3$	2×10^{-5}	$2{,}8 \times 10^8$
Fumarasa	Fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1{,}6 \times 10^8$
	Malato	9×10^2	$2{,}5 \times 10^{-5}$	$3{,}6 \times 10^7$
β-Lactamasa	Bencilpenicilina	$2{,}0 \times 10^3$	2×10^{-5}	1×10^8

Fuente: Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W. H. Freeman and Company, New York.

este caso). Una simple reestructuración de la Ecuación 6–26 dividiendo ambos lados por V_{max} da

$$\frac{V_0}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

La relación $V_0/V_{max} = 9{,}6\ \mu M\ s^{-1}/12\ \mu M\ s^{-1} = [S]/(K_m + [S])$. Este hecho simplifica enormemente la resolución de K_m, que da 0,25[S] o 10 μM.

EJEMPLO PRÁCTICO 6–2 Determinación de [S]

En otro experimento con la felicidasa en el que se utiliza una $[E_t] = 10$ nM, la velocidad de reacción, V_0, es de 3 $\mu M\ s^{-1}$. ¿Cuál es la [S] usada en este experimento?

Solución: Usando la misma lógica que en el Ejemplo Práctico 6–1, vemos que la V_{max} para esta concentración de enzima es 6 $\mu M\ s^{-1}$. Observe que la V_0 es exactamente la mitad que la V_{max}. Recuerde que K_m es, por definición, igual a la [S] en la que $V_0 = {}^1/_2\ V_{max}$. Por tanto, la [S] debe ser en este caso igual a la K_m, es decir, 10 μM. Si V_0 tuviera un valor distinto a ${}^1/_2\ V_{max}$, sería más sencillo usar la expresión $V_0/V_{max} = [S]/(K_m + [S])$ para obtener [S].

Muchos enzimas catalizan reacciones en las que intervienen dos o más sustratos

Hemos visto de qué modo la [S] afecta la velocidad de una reacción enzimática sencilla (S → P) en la que hay una sola molécula de sustrato. No obstante, en muchas reacciones enzimáticas se fijan al enzima dos (o incluso más) moléculas de sustrato diferentes que participan en la reacción. Por ejemplo, en la reacción catalizada por la hexoquinasa, el ATP y la glucosa son las moléculas de sustrato y el ADP y la glucosa 6-fosfato los productos:

$$\textbf{ATP + glucosa} \longrightarrow \textbf{ADP + glucosa 6-fosfato}$$

Las velocidades de tales reacciones bisustrato se pueden analizar según el método de Michaelis-Menten. La hexoquinasa tiene una K_m característica para cada uno de sus sustratos (Tabla 6-6)

Las reacciones enzimáticas en las que hay dos sustratos implican normalmente la transferencia de un átomo o un grupo funcional de un sustrato al otro. Tales reacciones transcurren por una o varias rutas diferentes. En algunos casos, ambos sustratos están fijados al enzima al mismo tiempo, formando en algún momento de la reacción un complejo ternario no covalente **(Fig. 6–13a)**; los sustratos pueden fijarse en una secuencia al azar o en un orden específico. En otros casos no se forma complejo ternario cuando el primer sustrato se convierte en producto y se disocia antes de que se una el segundo sustrato. Un ejemplo de esto es el mecanismo ping-pong o de doble desplazamiento (Fig. 6–13b). La cinética del estado estacionario puede ayudar a menudo a distinguir entre estas posibilidades **(Fig. 6–14)**.

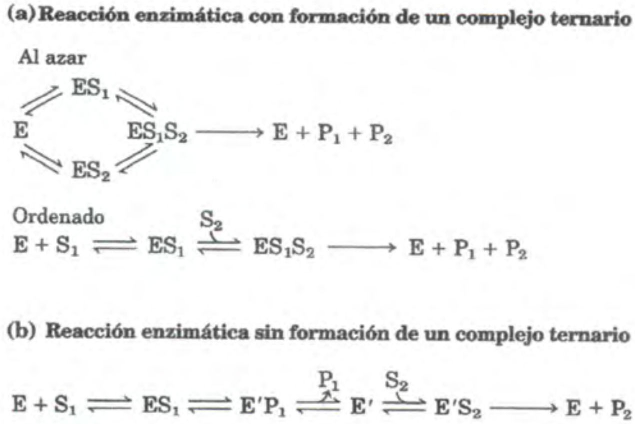


FIGURA 6–13 Mecanismos comunes de las reacciones bisustrato catalizadas enzimáticamente. **(a)** El enzima y ambos sustratos se unen formando un complejo ternario. En la unión ordenada, el sustrato 1 debe unirse antes de que el sustrato 2 se pueda unir de manera productiva. En la unión estadística o al azar, la unión de los sustratos se puede dar en cualquier orden. En **(b)** se forma un complejo enzima–sustrato, un producto abandona el complejo, el enzima modificado forma un segundo complejo con otra molécula de sustrato y sale el segundo producto, regenerando el enzima. El sustrato 1 puede transferir un grupo funcional al enzima (formando E′ modificado covalentemente) que es posteriormente transferido al sustrato 2. Éste es un mecanismo ping-pong o de doble desplazamiento.

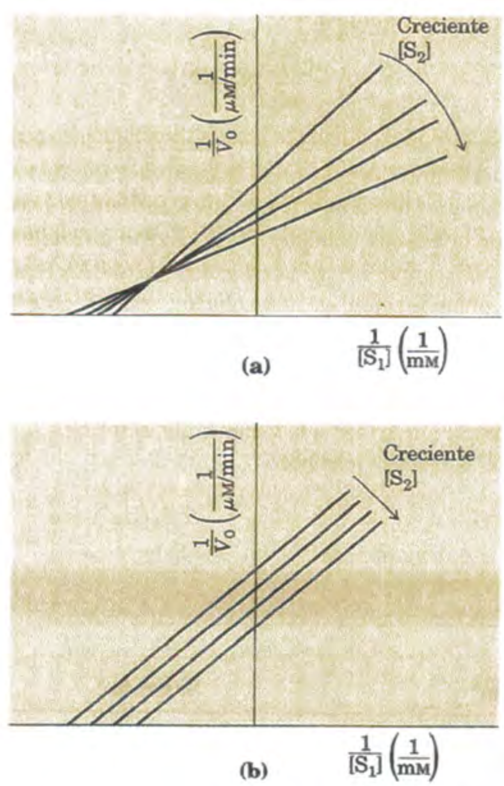


FIGURA 6–14 Análisis cinético en el estado estacionario de las reacciones bisustrato. En estas gráficas de dobles recíprocos (véase el Recuadro 6–1) se varía la concentración del sustrato 1 mientras que se mantiene constante la concentración del sustrato 2. Esto se repite para diversos valores de $[S_2]$, con lo que se generan varias líneas separadas. **(a)** Si las líneas se cortan se ha formado un complejo ternario en la reacción; **(b)** si son paralelas, la reacción transcurre a través de una ruta ping–pong o de doble desplazamiento.

La cinética del estado preestacionario puede aportar pruebas sobre pasos específicos de la reacción

Hemos considerado la cinética como el método principal para el estudio de los pasos de una reacción enzimática y hemos subrayado también las limitaciones de los parámetros cinéticos más comunes para poder proporcionar esta información. Los dos parámetros experimentales más importantes aportados por la cinética en el estado estacionario son k_{cat} y k_{cat}/K_m. La variación de estos parámetros con los cambios de pH o temperatura puede proporcionar en ocasiones información adicional sobre las etapas de una ruta de reacción. En el caso de las reacciones bisustrato, la cinética del estado estacionario puede ayudar a determinar si se forma o no un complejo ternario durante la reacción (Fig. 6–14). Una visión más completa requiere generalmente métodos cinéticos más sofisticados que están fuera del alcance de este texto introductorio. Aquí introduciremos de manera breve uno de los métodos cinéticos más importantes para estudiar los mecanismos de reacción: la cinética en el estado preestacionario.

La descripción completa de una reacción catalizada por un enzima requiere la medida directa de las velocidades de los pasos de reacción individuales, por ejemplo la medición de la asociación de enzima y sustrato para formar el complejo ES. Es durante el estado preestacionario (véase la p. 195) cuando se pueden medir de manera independiente las velocidades de muchos pasos de la reacción y cuando se pueden observar los acontecimientos que tienen lugar durante la reacción de una única molécula de sustrato. Dado que la fase del estado preestacionario de una reacción es, generalmente, muy corta, se requieren técnicas especializadas para la mezcla y obtención muy rápida de muestras y datos. Uno de los objetivos es disponer de una visión completa y cuantitativa del transcurso energético de la reacción. Tal como ya hemos observado, las velocidades de reacción y los equilibrios están relacionados con los cambios de energía libre que se producen durante la reacción. Otro objetivo consiste en medir la velocidad de los pasos individuales de la reacción. En algunos casos ha sido posible medir las velocidades de cada paso en una reacción enzimática con diversos pasos. En las descripciones de enzimas específicos que se da más adelante en la Sección 6.4 se incluyen algunos ejemplos de la aplicación de la cinética del estado preestacionario.

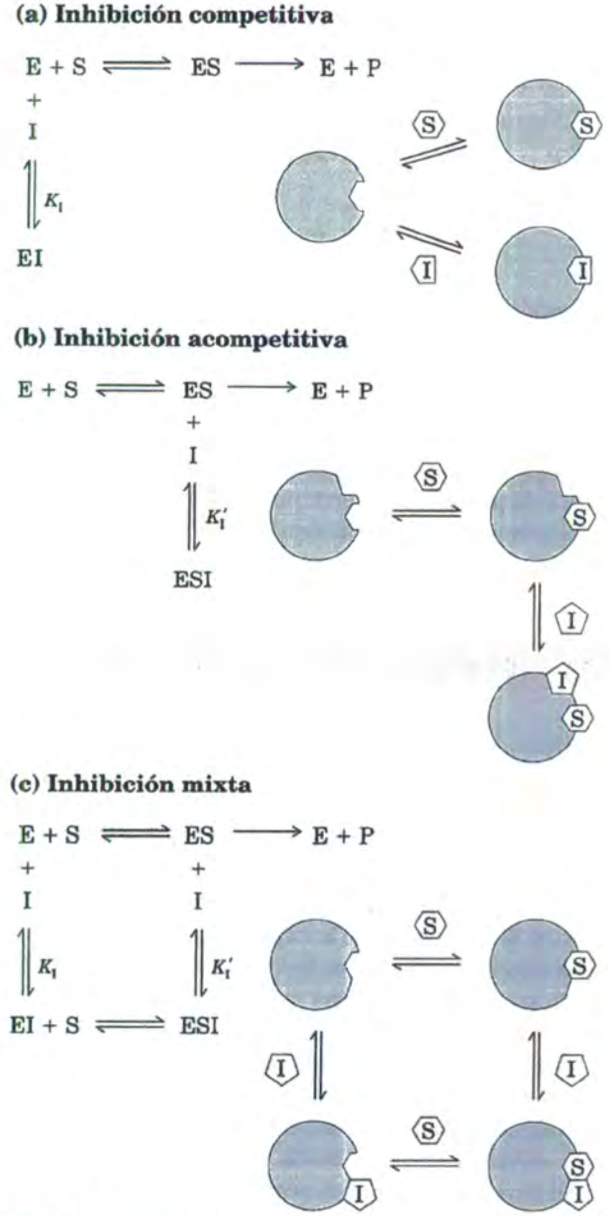


FIGURA 6–15 Tres tipos de inhibición reversible. (a) Los inhibidores competitivos se unen al sitio activo del enzima; K_I es la constante de equilibrio de la unión del inhibidor a E. (b) Los inhibidores acompetitivos se fijan en un sitio distinto, pero sólo se unen al complejo ES; K_I' es la constante de equilibrio de unión del inhibidor a ES. (c) Los inhibidores mixtos se unen a sitios separados, pero pueden unirse tanto a E como ES.

Los enzimas están sujetos a inhibición reversible o irreversible

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que interfieren en la catálisis, enlenteciéndola o deteniendo las reacciones enzimáticas. Los enzimas catalizan, virtualmente, todos los procesos celulares por lo que no es sorprendente que los inhibidores enzimáticos se encuentren entre los agentes farmacéuticos más importantes. Por ejemplo, la aspirina (acetilsalicilato) inhibe el enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de prostaglandinas, compuestos que intervienen en muchos procesos, algunos de los cuales producen dolor. El estudio de los inhibidores enzimáticos también ha proporcionado información valiosa sobre mecanismos enzimáticos y ha ayudado a definir algunas rutas metabólicas. Hay dos amplias clases de inhibidores enzimáticos: reversibles e irreversibles.

Inhibición reversible Un tipo de **inhibición reversible** frecuente es la que se denomina **inhibición competitiva (Fig. 6–15a)**. Un **inhibidor competitivo** compite con el sustrato por el sitio activo del enzima. Mientras el inhibidor (I) ocupa el sitio activo impide la fijación del sustrato al enzima. Muchos inhibidores competitivos son estructuralmente similares al sustrato que se combinan con el enzima formando un complejo EI, que no conduce a la catálisis. Incluso combinaciones transitorias de este tipo afectarán negativamente a la eficiencia del enzima. Al considerar la geometría molecular de los inhibidores que se parecen al sustrato podemos llegar a menudo a conclusiones sobre qué regiones de un sustrato normal interaccionan con el enzima. La inhibición competitiva se puede analizar cuantitativamente mediante cinética del estado esta-

cionario. En presencia de un inhibidor competitivo, la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 6–9) pasa a ser

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]} \qquad (6\text{–}28)$$

donde

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{y} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

La ecuación 6–28 describe las características importantes de la inhibición competitiva. El término αK_m determinado experimentalmente, la K_m observada en presencia de inhibidor, a menudo se denomina K_m "aparente".

Debido a que el inhibidor se une de manera reversible al enzima, se puede cambiar el sentido de la competición en favor del sustrato simplemente añadiendo más sustrato. Cuando [S] excede sobradamente a [I] se minimiza la probabilidad de que se fije una molécula de inhibidor, por lo que la reacción muestra una V_{max} normal. No obstante, la [S] a la cual $V_0 = {}^1/_2 V_{max}$, la K_m aparente, aumentará en presencia del inhibidor en un factor α. Este efecto sobre la K_m aparente y la ausencia de efecto sobre la V_{max} es diagnóstico de inhibición competitiva, y se pone de manifiesto fácilmente en una gráfica de dobles recíprocos (Recuadro 6–2). La constante de equilibrio para la fijación del inhibidor, K_I, puede obtenerse a partir de la misma gráfica.

La inhibición competitiva se utiliza en terapia médica para tratar pacientes que han ingerido metanol, disolvente que se utiliza como anticongelante. El enzima hepático alcohol deshidrogenasa convierte el metanol en formaldehído, un compuesto perjudicial para muchos tejidos. La ceguera es frecuentemente el resultado de la ingestión de metanol debido a que los ojos son especialmente sensibles al formaldehído. El etanol compite de manera efectiva con el metanol como sustrato de la alcohol deshidrogenasa. El efecto del etanol es muy parecido al de un inhibidor competitivo, con la distinción de que el etanol también es un sustrato y su concentra-

RECUADRO 6–2 Pruebas cinéticas para determinar los mecanismos de inhibición

La gráfica de los dobles recíprocos (véase el Recuadro 6–1) ofrece una forma fácil de determinar si un inhibidor enzimático es competitivo, acompetitivo o mixto. Se llevan a cabo dos grupos de experimentos de velocidad en los que la concentración de enzima se mantiene constante en cada grupo. En el primer grupo [S] también se mantiene constante, lo que permite medir el efecto del incremento de la concentración de inhibidor [I] sobre la velocidad inicial V_0 (no se muestra en la figura). En el segundo grupo [I] se mantiene constante y se varía [S]. En la gráfica de dobles recíprocos se representa $1/V_0$ frente a $1/[S]$.

La Figura 1 muestra un conjunto de gráficas de dobles recíprocos obtenidas en ausencia de inhibidor y a dos concentraciones diferentes de un inhibidor competitivo. El incremento de [I] da lugar a la producción de una familia de líneas con una intersección común en el eje $1/V_0$ pero con pendientes diferentes. Dado que la intersección sobre el eje $1/V_0$ es igual a $1/V_{max}$, podemos ver que V_{max} no cambia en presencia del inhibidor competitivo. Es decir, independientemente de la concentración de un inhibidor competitivo hay siempre una concentración de sustrato suficientemente elevada para desplazar al inhibidor del sitio activo del enzima. Encima de la gráfica se muestra la reordenación de la Ecuación 6–28 en la que se basa la representación. Se puede calcular el valor de α a partir del cambio de pendiente para cualquier valor de [I]. Conociendo [I] y α, se puede *calcular* K_I partir de la expresión

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

En la inhibición acompetitiva y mixta, representaciones similares de los datos de velocidad dan las familias de líneas que se ven en las Figuras 2 y 3. Los cambios en los puntos de intersección con los ejes indican cambios en V_{max} y K_m.

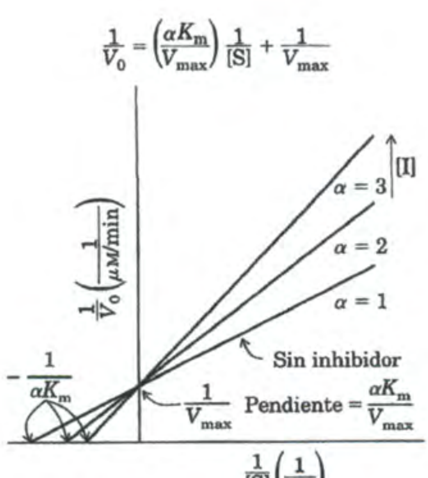


FIGURA 1 Inhibición competitiva.

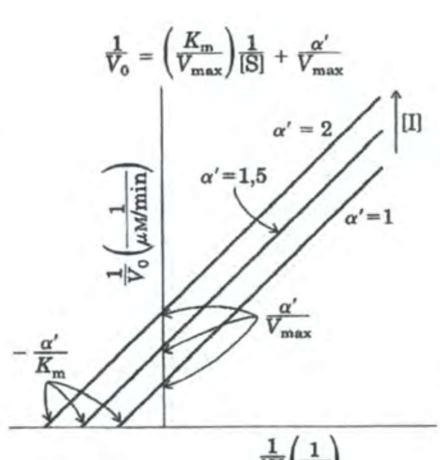


FIGURA 2 Inhibición acompetitiva.

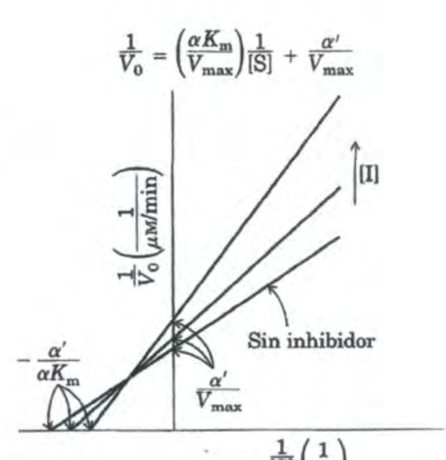


FIGURA 3 Inhibición mixta.

ción disminuirá con el tiempo a medida que el enzima lo convierta en acetaldehído. La terapia para el envenenamiento por metanol es la infusión intravenosa lenta de etanol a una velocidad que mantenga una concentración controlada en el torrente sanguíneo durante varias horas. Esto reduce la tasa de formación de formaldehído, reduciendo el peligro mientras los riñones filtran el metanol que se excretará inocuamente por la orina. ■

Hay otros dos tipos de inhibición reversible, acompetitiva y mixta, que a menudo se definen aplicados a enzimas con un solo sustrato pero que en la práctica sólo se observan con enzimas que actúan con dos o más sustratos. Un **inhibidor acompetitivo** (Fig. 6–15b) es el que se fija a un sitio distinto del que se fija el sustrato en el sitio activo y que, a diferencia del inhibidor competitivo, sólo se une al complejo ES. En presencia de un inhibidor acompetitivo, la ecuación de Michaelis-Menten cambia a

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \qquad (6\text{–}29)$$

donde

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \quad \text{y} \quad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Como se describe en la Ecuación 6–29, a elevadas concentraciones de sustrato, V_0 se aproxima a V_{max}/α'. Así, un inhibidor acompetitivo disminuye la V_{max} observada. La K_m aparente también disminuye debido a que la [S] necesaria para alcanzar la mitad de la V_{max} disminuye en un factor α'.

Un **inhibidor mixto** (Fig. 6–15c) también se fija a un sitio distinto al sustrato, pero se fija tanto a E como a ES. La ecuación de velocidad que describe a la inhibición mixta es

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \qquad (6\text{–}30)$$

donde α y α' se definen igual que anteriormente. Normalmente, un inhibidor mixto afecta tanto a K_m como a V_{max}. El caso especial en que $\alpha = \alpha'$, raramente encontrado en la práctica, se define clásicamente como **inhibición no competitiva.** Examine la Ecuación 6–30 para ver por qué un inhibidor no competitivo afectaría a V_{max} pero no a K_m.

La ecuación 6–30 se utiliza como una expresión general de los efectos de los inhibidores reversibles, quedando simplificada a las expresiones para la inhibición competitiva y acompetitiva cuando, respectivamente, $\alpha' = 1{,}0$ o $\alpha = 1{,}0$. A partir de esta expresión podemos resumir los efectos de los inhibidores sobre los parámetros cinéticos individuales. Para todos los inhibidores reversibles se cumple que la V_{max} aparente es igual V_{max}/α', porque el lado derecho de la ecuación 6–30 siempre se simplifica a V_{max}/α' a concentraciones de sustrato suficientemente grandes. En el caso de los inhibidores competitivos, $\alpha' = 1{,}0$ y podemos, por tanto, ignorar este parámetro. A partir de esta expresión para la V_{max} aparente podemos deducir una expresión para la K_m aparente y demostrar el cambio que se produce en este parámetro en presencia de inhibidores reversibles. La K_m aparente es, como siempre, igual a la [S] a la que la V_0 es la mitad de la V_{max} aparente o, de modo más general, aquella a la que $V_0 = V_{max}/2\alpha'$. Se llega a esta situación cuando $[S] = \alpha K_m/\alpha'$. De este modo, la K_m aparente es igual a $\alpha K_m/\alpha'$. Esta expresión es más simple cuando α o α' son igual a 1,0 (para inhibidores acompetitivos o competitivos), como se resume en la Tabla 6–9.

TABLA 6–9 Efectos de inhibidores reversibles sobre los valores de V_{max} y de K_m aparentes

Tipo de inhibidor	V_{max} aparente	K_m aparente
Ninguno	V_{max}	K_m
Competitivo	V_{max}	αK_m
Acompetitivo	V_{max}/α'	K_m/α'
Mixto	V_{max}/α'	$\alpha K_m/\alpha'$

En la práctica, las inhibiciones mixta y acompetitiva sólo se observan en enzimas con dos o más sustratos (por ejemplo, S_1 y S_2) y son muy importantes en el análisis experimental de estos enzimas. Si un inhibidor se fija en un sitio normalmente ocupado por S_1, puede actuar como un inhibidor competitivo en los experimentos en los que varía la $[S_1]$. Si un inhibidor se fija en un sitio normalmente ocupado por S_2, puede actuar como un inhibidor mixto o acompetitivo de S_1. Los patrones reales de inhibición observados dependen de si los acontecimientos de fijación de S_1 y S_2 son ordenados o se producen al azar, y por consiguiente se pueda determinar el orden en que los sustratos se fijan y los productos se liberan del sitio activo. A menudo el uso de uno de los productos de reacción como inhibidor puede ser especialmente informativo. Si sólo está presente uno de los dos productos de reacción, no se puede dar la reacción inversa. Sin embargo, un producto se fijará generalmente en alguna parte del sitio activo para así funcionar como un inhibidor.

Los enzimólogos llevan a cabo elaborados estudios cinéticos con diversas combinaciones y cantidades de productos e inhibidores con el fin de obtener una imagen detallada del mecanismo de las reacciones bisustrato.

EJEMPLO PRÁCTICO 6–3 Efecto de un inhibidor sobre la K_m

El grupo de investigación que trabaja con la felicidasa (véanse los Ejemplos Prácticos 6–1 y 6–2, pp. 199, 200) descubren que el compuesto STRESS es un potente inhibidor competitivo de la felicidasa. La adición de STRESS 1 nM aumenta la K_m observada para TRISTE en un factor de 2. ¿Cuáles son los valores de α y α' en estas condiciones?

Solución: Recuerde que la K_m aparente, la K_m medida en presencia de un inhibidor competitivo, se define como αK_m. Puesto que la K_m para TRISTE aumenta en un factor de 2 en presencia de STRESS 1nM, el valor de α debe ser 2. El valor de α' es 1 por definición para una inhibición competitiva.

Inhibición irreversible Los **inhibidores irreversibles** se unen de manera covalente, destruyen un grupo funcional del enzima que es esencial para su actividad o forman una asociación no covalente muy estable. Es frecuente la formación de un enlace covalente entre un inhibidor irreversible y un enzima.

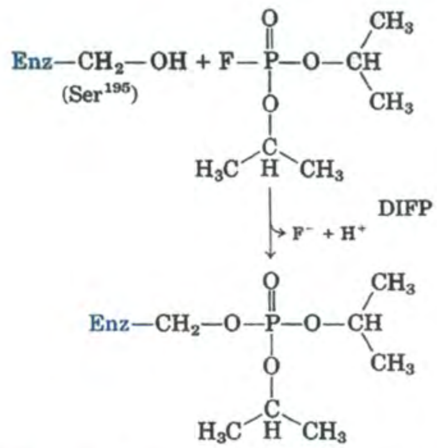


FIGURA 6–16 Inhibición irreversible. La reacción de la quimotripsina con el diisopropilfluorofosfato (DIFP), que modifica la Ser[195], inhibe el enzima irreversiblemente. Esta reacción condujo al descubrimiento de que la Ser[195] es el residuo clave del sitio activo de la quimotripsina.

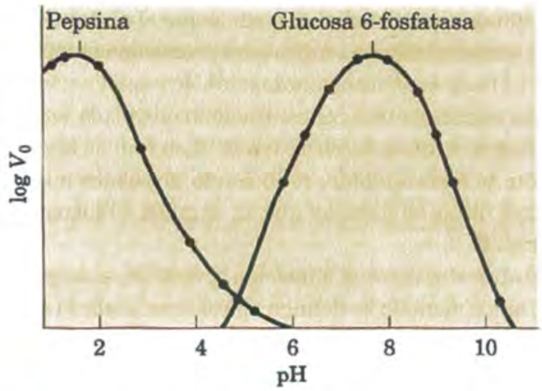


FIGURA 6–17 Perfiles de actividad frente al pH de dos enzimas. Estas curvas se construyen a partir de medidas de las velocidades iniciales cuando la reacción se lleva a cabo en tampones de pH diferentes. Debido a que el pH es una escala logarítmica que expresa cambios de diez veces en $[H^+]$, los cambios en V_0 también están representados en escala logarítmica. El pH óptimo de actividad de un enzima es generalmente un reflejo del pH del ambiente celular en el que se encuentra normalmente. La pepsina, que hidroliza ciertos enlaces peptídicos de proteínas durante la digestión en el estómago, tiene un pH óptimo alrededor de 1,6. El pH del jugo gástrico se encuentra entre 1 y 2. La glucosa 6–fosfatasa de los hepatocitos (células del hígado), con un pH óptimo alrededor de 7,8 es responsable de la liberación de glucosa a la sangre. El pH normal del citosol de los hepatocitos está alrededor de 7,2.

Los inhibidores irreversibles son también muy útiles para estudiar los mecanismos de reacción. Los aminoácidos con funciones catalíticas clave en el sitio activo pueden ser identificados, en ocasiones, determinando qué aminoácido se ha unido covalentemente a un inhibidor después de la inactivación del enzima. En la **Figura 6–16** se muestra un ejemplo.

Un caso muy especial de inhibidores irreversibles son los **inactivadores suicidas.** Estos compuestos son relativamente poco reactivos hasta que se unen al sitio activo de un enzima específico. Un inactivador suicida pasa a través de los primeros pasos de la reacción enzimática normal, pero a continuación se convierte en un compuesto muy reactivo que se combina irreversiblemente con el enzima en lugar de ser transformado en el producto normal. A estos compuestos también se los denomina **inactivadores basados en el mecanismo** ya que utilizan el mecanismo de reacción enzimático normal para inactivar el enzima. Los inactivadores suicidas juegan un papel central en el *diseño racional de fármacos*, un método moderno para la obtención de nuevos agentes farmacéuticos mediante el que se sintetizan nuevos sustratos en base al conocimiento adquirido sobre sustratos y mecanismos de reacción. Un inactivador suicida bien diseñado es específico para un único enzima y no reacciona hasta que se halla en el sitio activo del mismo, por lo que los fármacos basados en este método suelen presentar la importante ventaja de tener pocos efectos secundarios (véase el Recuadro 22–3). Al final de la Sección 6.4 se describen algunos ejemplos de inhibidores irreversibles que tienen cierta importancia médica.

La actividad enzimática depende del pH

Los enzimas tienen un pH óptimo o un intervalo de pH en el que su actividad es máxima **(Fig. 6–17)**; a valores superiores o inferiores de pH la actividad disminuye. Esto no es sorprendente dado que algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o bases débiles que desarrollan funciones críticas en el sitio activo del enzima y que dependen del mantenimiento de un cierto estado de ionización, mientras que en otras zonas de la proteína algunas cadenas laterales ionizadas pueden jugar un papel esencial en las interacciones que mantiene la estructura de la proteína. La eliminación de un protón de un residuo His podría, por ejemplo, eliminar una interacción iónica esencial para la estabilización de la conformación activa del enzima. Menos frecuentes son los casos en los que la sensibilidad al pH tenga relación con la titulación de un grupo del sustrato.

El intervalo de pH en el que cambia la actividad del enzima puede proporcionar alguna pista sobre qué tipo de aminoácido está implicado (véase la Tabla 3–1). Por ejemplo, un cambio en la actividad enzimática cerca de pH 7,0 refleja frecuentemente la titulación de un residuo His. No obstante, el efecto del pH ha de interpretarse con cautela. En el ambiente compacto de una proteína, el pK_a de las cadenas laterales de los aminoácidos puede cambiar significativamente. Por ejemplo, una carga positiva próxima puede disminuir el pK_a de un residuo Lys mientras que la proximidad de una carga negativa puede aumentarlo. Estos efectos dan lugar, en ocasiones, a valores de pK_a que varían en varias unidades en comparación con los de los aminoácidos libres. Por ejemplo, en el enzima acetoacetato descarboxilasa hay un residuo Lys que tiene un pK_a de 6,6 (el normal en la lisina libre es de 10,5) debido a efectos electrostáticos de cargas positivas cercanas.

RESUMEN 6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo

- Muchos enzimas comparten algunas propiedades cinéticas. Cuando se añade sustrato a un enzima, la reacción llega rápidamente a un estado estacionario en el que la

velocidad a la que se forma el complejo ES se equilibra con la velocidad a la que se descompone. Al aumentar [S] aumenta la actividad de un enzima a concentración fija en el estado estacionario; este aumento se produce siguiendo una curva hiperbólica que tiende a su máximo valor de velocidad, V_{max}, en el cual prácticamente todo el enzima ha formado complejo con su sustrato.

- La concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de V_{max} es la constante de Michaelis, K_m, que es característica para cada enzima que actúa sobre un sustrato determinado. La ecuación de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

relaciona la velocidad inicial con [S] y V_{max} a través de la constante K_m. La cinética de Michaelis-Menten se denomina también cinética del estado estacionario.

- K_m y V_{max} tienen significados diferentes para diferentes enzimas. La velocidad limitante de una reacción catalizada por un enzima en condiciones de saturación se describe mediante la constante k_{cat}, o número de recambio. La relación k_{cat}/K_m proporciona una buena medida de la eficiencia catalítica. La ecuación de Michaelis-Menten también es aplicable a reacciones bisustrato, que tienen lugar a través de la formación de complejos ternarios o mediante mecanismos ping-pong (de doble desplazamiento).
- La inhibición reversible de un enzima puede ser competitiva, acompetitiva o mixta. Los inhibidores competitivos compiten con el sustrato por su unión reversible al sitio activo, pero no son transformados por el enzima. Los inhibidores acompetitivos sólo se unen al complejo ES en un sitio distinto del sitio activo. Los inhibidores mixtos se unen a E o a ES, también en un sitio distinto del sitio activo. Un inhibidor irreversible se une permanentemente a un sitio activo, ya sea formando un enlace covalente o una interacción no covalente muy estable.
- Todos los enzimas tienen un pH óptimo (o un margen de pH óptimo) en el que presentan la máxima actividad.

6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas

Este capítulo se ha centrado hasta ahora en los principios generales de la catálisis y en una introducción a algunos de los parámetros cinéticos utilizados para describir la acción enzimática. Nos centraremos ahora en algunos ejemplos específicos de mecanismos de reacción enzimáticos.

La comprensión del mecanismo de acción completo de un enzima purificado requiere la identificación de todos los sustratos, cofactores, productos y reguladores. Además requiere un conocimiento de (1) la secuencia temporal en la que se producen los intermedios de reacción unidos al enzima, (2) la estructura de cada intermedio y de cada estado de transición, (3) las velocidades de interconversión entre los intermedios, (4) la relación estructural del enzima con cada intermedio y (5) las contribuciones energéticas de todos los grupos reactivos e interaccionantes con respecto a los complejos intermedios y a los estados de transición. Probablemente no existe ningún enzima del que conozcamos ya todos estos datos.

A continuación se presentan los mecanismos de cuatro enzimas: quimotripsina, hexoquinasa, enolasa y lisozima. Con ellos no se pretende cubrir todo el espectro de la química enzimática. Su elección se debe en parte a que se cuentan entre los enzimas mejor conocidos y en parte a que ilustran claramente algunos principios generales esbozados en este capítulo. La discusión se concentra en principios seleccionados junto con algunos experimentos clave que han ayudado a su demostración. El ejemplo de la quimotripsina se utiliza para revisar algunas de las convenciones utilizadas para describir mecanismos enzimáticos. No se incluye gran parte de los detalles mecanísticos y de las pruebas experimentales; ningún libro podría documentar completamente la rica historia experimental de estos enzimas. Tampoco se entra a discutir la contribución especial de los coenzimas en la actividad catalítica de muchos enzimas. La química coenzimática es muy variada y describiremos cada uno de los casos al tiempo que nos vamos encontrando con ellos en la Parte II.

El mecanismo de la quimotripsina implica acilación y desacilación de un residuo Ser

La quimotripsina pancreática bovina (M_r 25.191) es una proteasa, un enzima que cataliza la rotura hidrolítica de enlaces peptídicos. Esta proteasa actúa específicamente sobre los enlaces peptídicos adyacentes a residuos aminoácidos aromáticos (Trp, Phe, Tyr). En la **Figura 6–18** se muestra la estructura tridimensional de la quimotripsina, realzándose los grupos funcionales del sitio activo. La reacción catalizada por este enzima ilustra el principio de la estabilización del estado de transición a la par que proporciona un ejemplo clásico de la utilización de la catálisis ácido-base general y de la catálisis covalente.

La quimotripsina aumenta la velocidad de hidrólisis del enlace peptídico en un factor de al menos 10^9. El enzima no cataliza el ataque directo del agua sobre el enlace peptídico sino que, en su lugar, se forma un intermedio acil-enzima covalente transitorio. Así, la reacción tiene dos fases distintas. En la fase de acilación se rompe el enlace peptídico y se forma un enlace éster entre el carbono carbonílico del péptido y el enzima. En la fase de desacilación se hidroliza el enlace éster, regenerándose el enzima no acilado.

La primera prueba de la formación de un intermedio acil-enzima covalente se dedujo a partir de una aplicación clásica de la cinética en el estado preestacionario. Además de su actuación sobre polipéptidos, la quimotripsina también cataliza la hidrólisis de pequeños compuestos éster y amida. Estas reacciones son mucho más lentas que la hidrólisis de péptidos debido a que la energía de fijación disponible es menor con estos sustratos pequeños, por lo que son mucho más fáciles de estudiar. Los experimentos de B.S. Hartley y B.A. Kilby en 1954 mostraron que la hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato por la quimotripsina, medida a partir la liberación de *p*-nitrofenol tenía lugar a través de una rápida explosión inicial (burst) antes de estabilizarse a una velocidad menor **(Fig. 6–19)**. Por extrapolación a tiempo cero, concluyeron que la fase de "burst" correspondía prácticamente a una molécula de *p*-nitrofenol liberada por cada molécula de enzima presente. Hartley y Kilby sugirieron que ello representaba una acilación rápida de todas

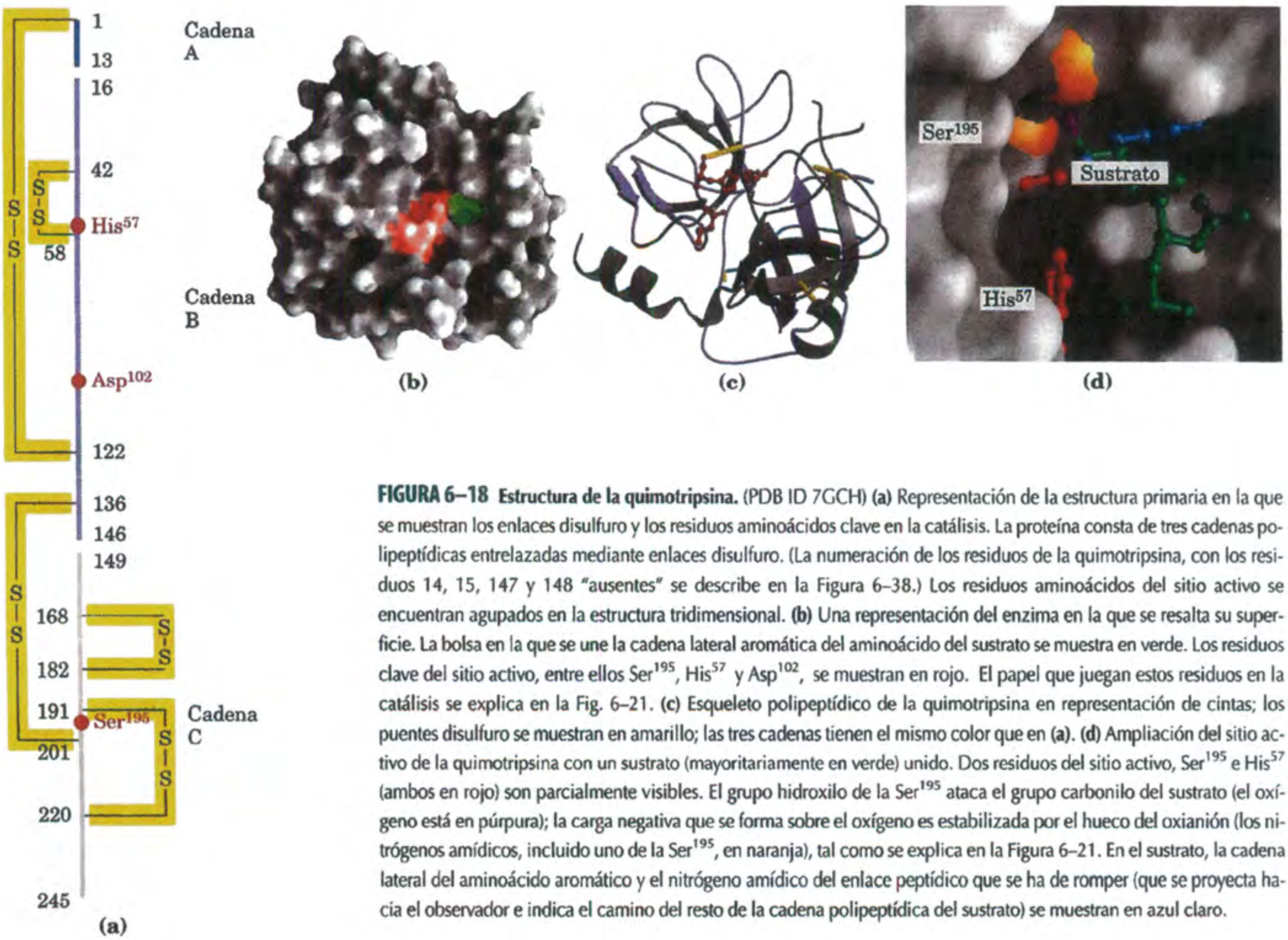


FIGURA 6–18 Estructura de la quimotripsina. (PDB ID 7GCH) **(a)** Representación de la estructura primaria en la que se muestran los enlaces disulfuro y los residuos aminoácidos clave en la catálisis. La proteína consta de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas mediante enlaces disulfuro. (La numeración de los residuos de la quimotripsina, con los residuos 14, 15, 147 y 148 "ausentes" se describe en la Figura 6–38.) Los residuos aminoácidos del sitio activo se encuentran agupados en la estructura tridimensional. **(b)** Una representación del enzima en la que se resalta su superficie. La bolsa en la que se une la cadena lateral aromática del aminoácido del sustrato se muestra en verde. Los residuos clave del sitio activo, entre ellos Ser^{195}, His^{57} y Asp^{102}, se muestran en rojo. El papel que juegan estos residuos en la catálisis se explica en la Fig. 6–21. **(c)** Esqueleto polipeptídico de la quimotripsina en representación de cintas; los puentes disulfuro se muestran en amarillo; las tres cadenas tienen el mismo color que en **(a)**. **(d)** Ampliación del sitio activo de la quimotripsina con un sustrato (mayoritariamente en verde) unido. Dos residuos del sitio activo, Ser^{195} e His^{57} (ambos en rojo) son parcialmente visibles. El grupo hidroxilo de la Ser^{195} ataca el grupo carbonilo del sustrato (el oxígeno está en púrpura); la carga negativa que se forma sobre el oxígeno es estabilizada por el hueco del oxianión (los nitrógenos amídicos, incluido uno de la Ser^{195}, en naranja), tal como se explica en la Figura 6–21. En el sustrato, la cadena lateral del aminoácido aromático y el nitrógeno amídico del enlace peptídico que se ha de romper (que se proyecta hacia el observador e indica el camino del resto de la cadena polipeptídica del sustrato) se muestran en azul claro.

las moléculas de enzima (con liberación de *p*-nitrofenol) y que la velocidad del posterior retorno del enzima a su estado libre estaba limitada por un paso de desacilación lento. Desde entonces se han obtenido resultados parecidos con muchos enzimas. Esta observación de la fase de "burst" proporciona otro ejemplo del uso de la cinética en el desglose de una reacción en sus etapas constituyentes.

Se han deducido otras características del mecanismo de la quimotripsina mediante el análisis de la dependencia de la reacción con el pH. La velocidad de la hidrólisis catalizada por la quimotripsina representada frente al pH suele presentar forma de campana **(Fig. 6–20)**. Las velocidades representadas en la Figura 6–20a se obtuvieron a concentraciones de sustrato bajas (por debajo de saturación) y son indicativas

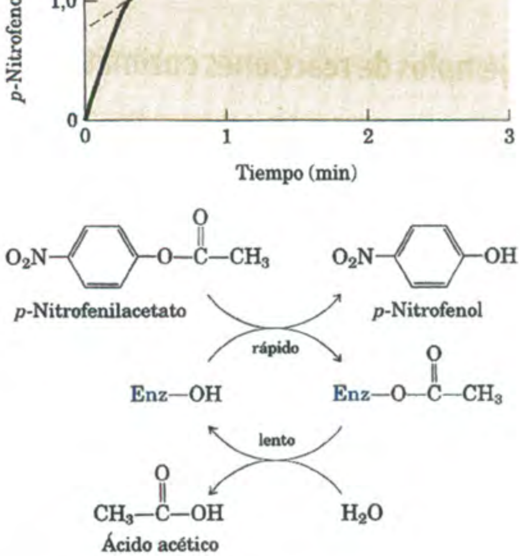


FIGURA 6–19 Pruebas cinéticas en el estado preestacionario de la existencia de un intermedio acil-enzima. La hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato por la quimotripsina se mide por la liberación del *p*-nitrofenol (un producto coloreado). Inicialmente, se observa una liberación rápida (burst) de una cantidad de *p*-nitrofenol que es casi estequiométrica con la cantidad de enzima presente. Esto es consecuencia de la fase rápida de acilación de la reacción. La velocidad posterior es menor porque el recambio del enzima viene limitado por la velocidad de la fase más lenta de desacilación.

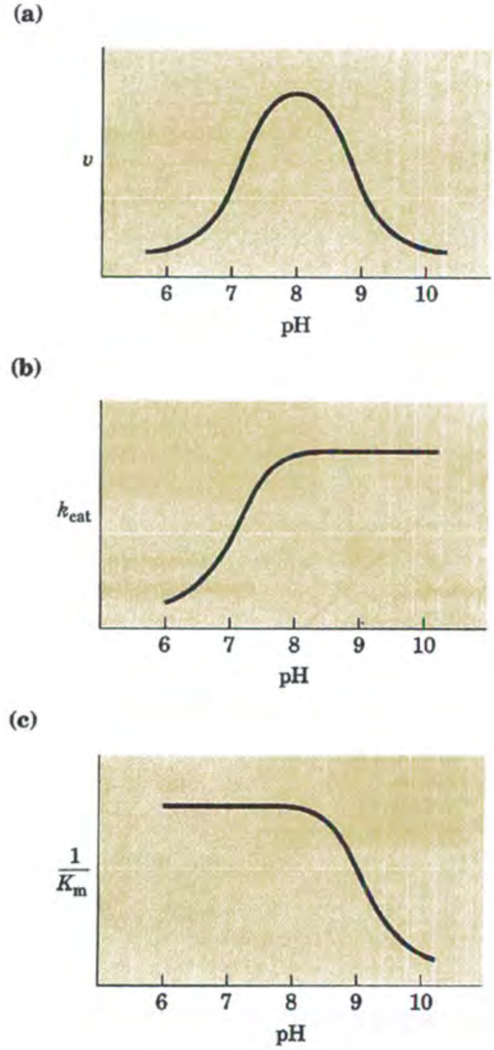


FIGURA 6–20 Dependencia del pH de la reacción catalizada por la quimotripsina. **(a)** La velocidad de la reacción catalizada por la quimotripsina representada frente al pH genera una curva en forma de campana con un pH óptimo a 8,0. La velocidad (v) que se representa se ha obtenido a bajas concentraciones de sustrato y refleja, por tanto, el término k_{cat}/K_m. La gráfica se puede descomponer usando métodos cinéticos para determinar separadamente los términos k_{cat} y k_m a cada pH. Cuando se hace esta descomposición, **(b** y **c)**, queda claro que la transición que se produce justo por encima de pH 7 es debida a cambios en k_{cat}, mientras que la que se produce por encima de pH 8,5 es debida a cambios en $1/K_m$. Estudios cinéticos y estructurales han demostrado que las transiciones ilustradas en **(b)** y **(c)** reflejan los estados de ionización de la cadena lateral de la His^{57} (cuando no hay sustrato unido) y del grupo α-amino de la Ile^{16} (en el extremo amino de la cadena B), respectivamente. His^{57} debe estar desprotonada e Ile^{16} debe estar protonada para alcanzar la actividad óptima.

por tanto del valor de k_{cat}/K_m (vea la Ec. 6–27, p. 199). La gráfica se puede diseccionar mediante la obtención en primer lugar de las velocidades máximas a cada pH para representar a continuación los valores de k_{cat} sola con respecto al pH (Fig. 6–20b); después de obtener la K_m a cada pH es posible representar los valores de $1/K_m$ (Fig. 6–20c). Estudios cinéticos y estructuraless han demostrado que los cambios en k_{cat} reflejan el estado de ionización de la His^{57}. El descenso de k_{cat} a pH bajo es el resultado de la protonación de la His^{57} (que no puede en esta situación extraer un protón de la Ser^{195} en el paso ① de la reacción; véase la **Fig. 6–21**). Esta reducción en la velocidad ilustra la importancia de la catálisis ácido–base general en el mecanismo de la quimotripsina. Los cambios en $1/K_m$ reflejan la ionización del grupo α-amino de Ile^{16} (en el extremo amino terminal de una de las tres cadenas polipeptídicas de la quimotripsina). Este grupo forma un puente salino con el Asp^{194}, que estabiliza la conformación activa del enzima. Cuando este grupo pierde su protón a pH elevado, desaparece el puente salino y se produce un cambio de conformación que cierra la bolsa hidrofóbica donde se inserta la cadena lateral aromática del sustrato (Fig. 6–18). En esta situación los sustratos ya no pueden unirse adecuadamente, lo que se refleja cinéticamente en forma de un aumento en la K_m.

El nucleófilo que interviene en la fase de acilación es el oxígeno de la Ser^{195}. (Las proteasas con un residuo Ser implicado en el mecanismo catalítico se denominan serina–proteasas.) El pK_a del grupo hidroxilo de una Ser es generalmente demasiado elevado para que la forma no protonada se halle presente en concentraciones significativas a pH fisiológico. Sin embargo, en la quimotripsina la Ser^{195} está unida a la His^{57} y al Asp^{102} a través de una red de enlaces de hidrógeno que se conoce como **tríada catalítica.** Cuando un sustrato peptídico se une a la quimotripsina se produce un ligero cambio de la conformación que comprime el enlace de hidrógeno entre His^{57} y Asp^{102}, lo que genera una interacción más fuerte, denominada enlace de hidrógeno de baja barrera energética. Esta interacción estabilizada aumenta el pK_a de la His^{57} desde un valor de ~7 (para la histidina libre) a más de 12, lo que permite que el residuo de His actúe como una base general más fuerte que puede extraer el protón del grupo hidroxilo de la Ser^{195}. La desprotonación impide el desarrollo de una carga positiva muy inestable sobre el hidroxilo de la Ser^{195} al tiempo que hace que la cadena lateral de la Ser se convierta en un nucleófilo más fuerte. En fases posteriores de la reacción, la His^{57} también actúa como dador de protones, protonando el grupo amino libre de la parte desplazada del sustrato (el grupo saliente).

Cuando el oxígeno de la Ser^{195} ataca el grupo carbonilo del sustrato, se forma un intermedio tetraédrico de vida muy corta en el que el oxígeno carbonílico adquiere una carga negativa (Fig. 6–21, paso ②). Esta carga, formada en el interior de una bolsa del enzima denominada hueco del oxianión, se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno con los grupos amida de dos enlaces peptídicos del esqueleto de la proteína. Uno de estos enlaces de hidrógeno (el que corre a cargo de la Gly^{193}) está presente solamente en este intermedio y en los estados de transición que conducen a su formación y descomposición, reduciendo la energía necesaria para llegar a ellos. Esto constituye un ejemplo de la utilización de la energía de fijación en la catálisis.

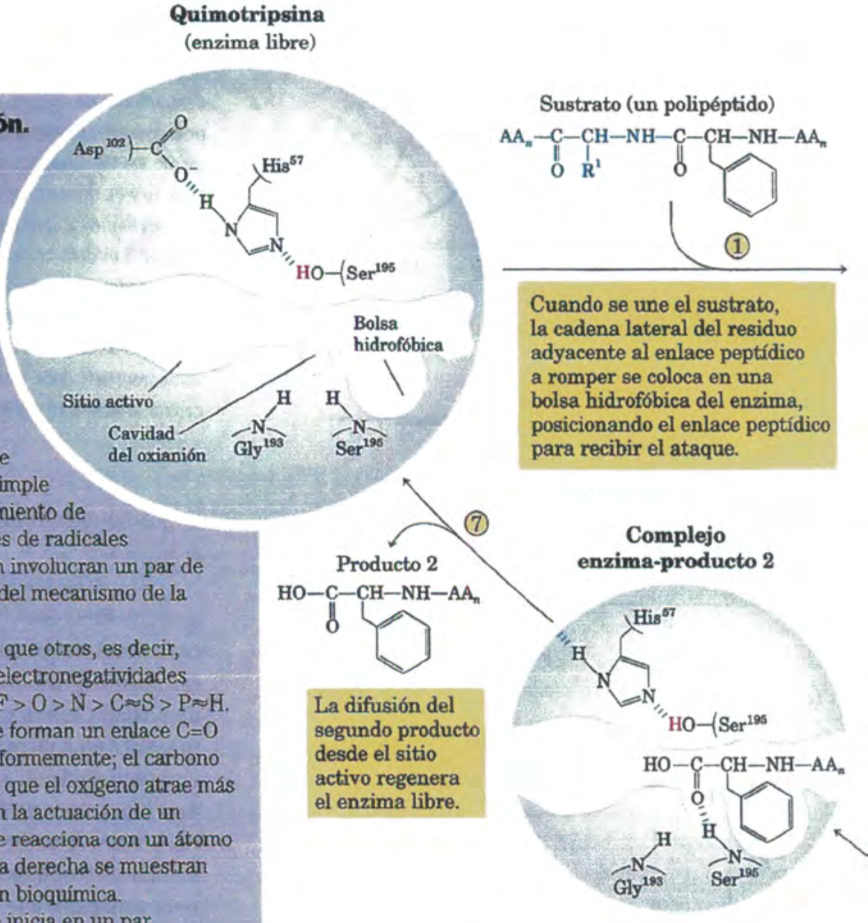
En el Recuadro 6–3 se explora más a fondo el papel de la complementariedad del estado de transición en la catálisis enzimática.

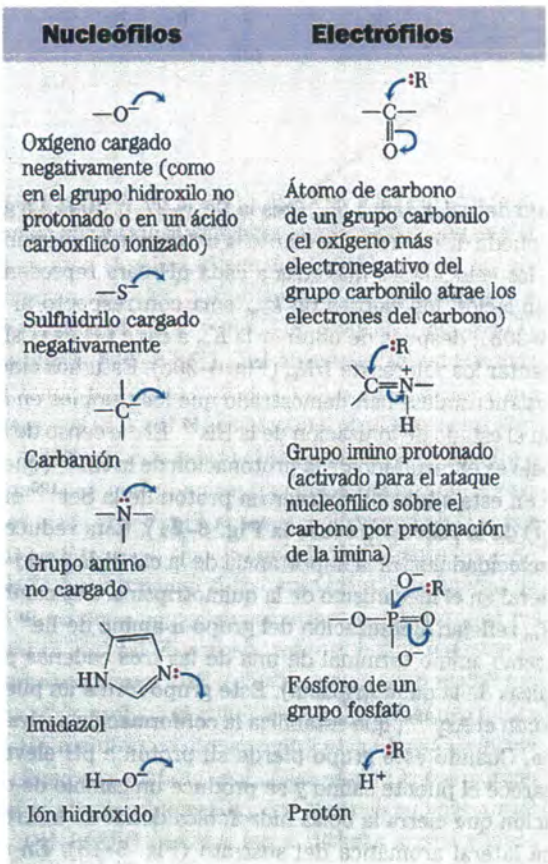
Cómo leer mecanismos de reacción. Un repaso

Los mecanismos de reacción química, que describen la formación y rotura de enlaces covalentes, se representan con puntos y con flechas curvadas, una convención conocida informalmente como "empuje electrónico". Un enlace covalente consiste en un par de electrones compartido. Los electrones no enlazados que son importantes para el mecanismo de reacción se designan con puntos (—ÖH). Las flechas curvadas (⌒) representan el movimiento de pares de electrones. Las flechas de cabeza simple (en forma de anzuelo) se usan para el movimiento de un solo electrón (⌒) (como en las reacciones de radicales libres). La mayoría de pasos de una reacción involucran un par de electrones no compartido (como en el caso del mecanismo de la quimotripsina).

Algunos átomos son más electronegativos que otros, es decir, atraen más fuertemente los electrones. Las electronegatividades relativas que se discuten en este texto son F > O > N > C≈S > P≈H. Por ejemplo, los dos pares de electrones que forman un enlace C=O (carbonilo) no se encuentran repartidos uniformemente; el carbono es relativamente electrodeficiente, mientras que el oxígeno atrae más a los electrones. Muchas reacciones implican la actuación de un átomo rico en electrones (un nucleófilo) que reacciona con un átomo deficiente en electrones (un electrófilo). A la derecha se muestran algunos nucleófilos y electrófilos comunes en bioquímica.

En general, un mecanismo de reacción se inicia en un par electrónico no compartido de un nucleófilo. En los diagramas de mecanismos, la base de la flecha de empuje electrónico está situada cerca de los puntos del par de electrones, y la cabeza apunta directamente al centro electrofílico que está siendo atacado. Allí donde un par de electrones no compartido confiera una carga negativa formal al nucleófilo, el mismo signo negativo puede representar al par de electrones no compartido y servir de base de la flecha. En el mecanismo de la quimotripsina, el par de electrones nucleofílico del complejo ES entre los pasos ① y ② es aportado por el oxígeno del grupo hidroxilo de la Ser[195]. Este par de electrones (2 de los 8 electrones de valencia del oxígeno hidroxílico) constituye la base de la flecha curvada. El centro electrofílico que está siendo atacado es el carbono carbonílico del enlace peptídico a romper. Los átomos de C, O y N tienen un máximo de 8 electrones de valencia, mientras que el H tiene un máximo de 2. Estos átomos se encuentran ocasionalmente en estados inestables con una dotación electrónica inferior al máximo posible, pero C, O y N no pueden tener nunca más de 8 electrones. De este modo, cuando el par de electrones de la Ser[195] de la quimotripsina ataca al carbono carbonílico del sustrato, se produce el desplazamiento de un par de electrones de la capa de valencia del carbono (¡no es posible tener cinco enlaces en un carbono!). Estos electrones se desplazan hacia el oxígeno carbonílico más electronegativo. El oxígeno tiene 8 electrones de valencia tanto antes como después de este proceso químico, pero el número de los compartidos se reduce de 4 a 2, con lo que el oxígeno carbonílico adquiere una carga negativa. En el paso siguiente, el par de electrones que le confiere la carga negativa al oxígeno vuelve atrás para reformar el enlace con el carbono, restableciendo la unión carbonílica. También en este caso se debe desplazar un par de electrones del carbono, concretamente el compartido con el grupo amino del enlace peptídico. Este último paso rompe el enlace peptídico. Los pasos siguientes siguen procesos similares.





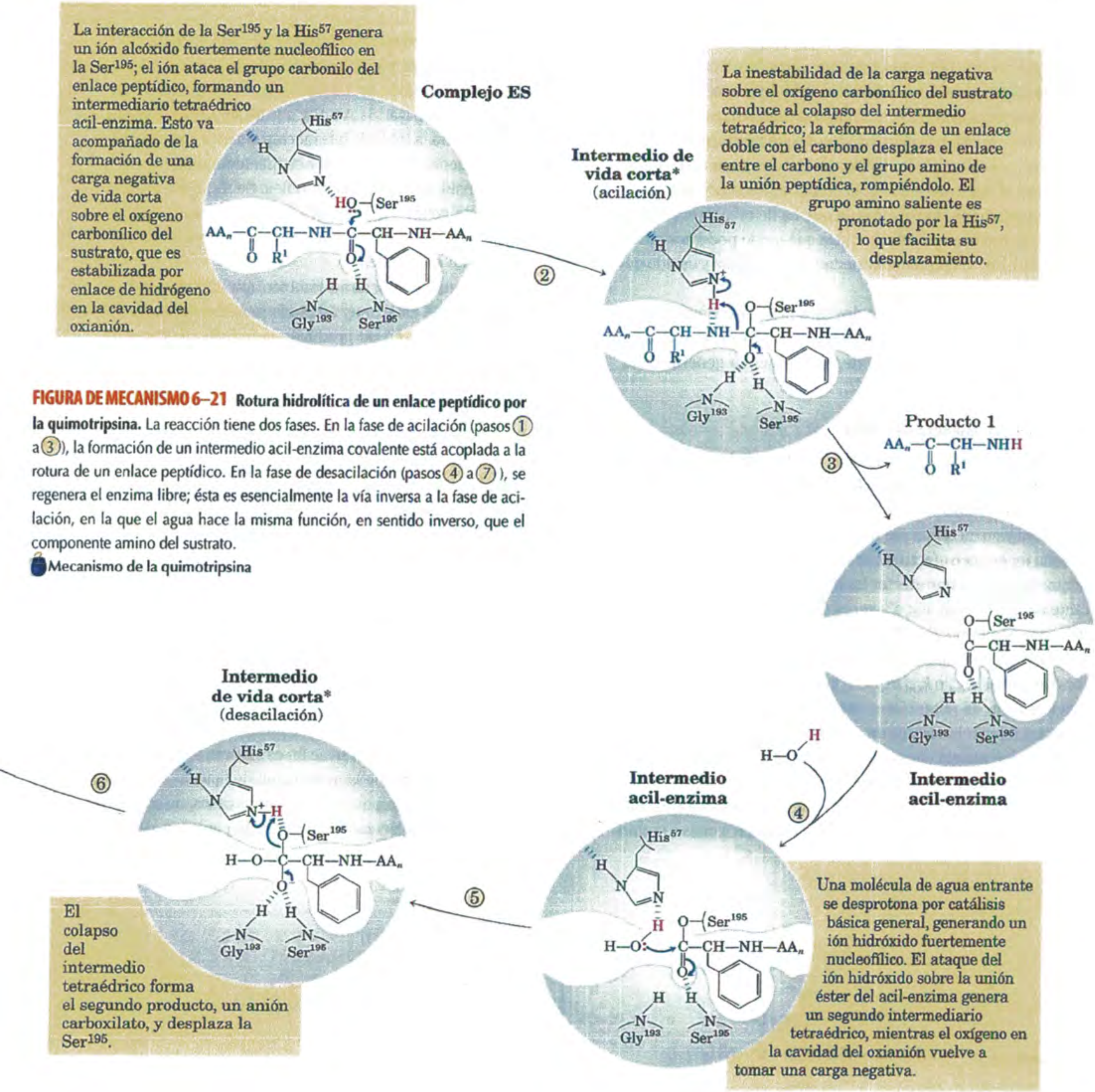


FIGURA DE MECANISMO 6–21 Rotura hidrolítica de un enlace peptídico por la quimotripsina. La reacción tiene dos fases. En la fase de acilación (pasos ① a ③), la formación de un intermedio acil-enzima covalente está acoplada a la rotura de un enlace peptídico. En la fase de desacilación (pasos ④ a ⑦), se regenera el enzima libre; ésta es esencialmente la vía inversa a la fase de acilación, en la que el agua hace la misma función, en sentido inverso, que el componente amino del sustrato.

Mecanismo de la quimotripsina

*Al intermedio tetraédrico encontrado en la ruta de reacción de la quimotripsina, así como al segundo intermedio tetraédrico que se forma más adelante, se les denomina a veces estados de transición, lo que puede dar lugar a confusión. Un *intermedio* es cualquier especie química con un tiempo de vida finito, entendiéndose por "finito" un tiempo superior a una vibración molecular (~10^{-13} segundos). Un *estado de transición* es, simplemente, la especie de máxima energía que se forma en la coordenada de reacción y no tiene un tiempo de vida finito. Los intermedios tetraédricos que se forman en la reacción de la quimotripsina se parecen mucho, tanto energética como estructuralmente, a los estados de transición que llevan a su formación y degradación. No obstante, el intermedio representa un paso comprometido en la formación completa de un enlace, mientras que el estado de transición es parte del proceso de reacción. En el caso de la quimotripsina, dada la estrecha relación entre el intermedio y el estado de transición real, se pasa por alto de manera rutinaria esta distinción. Además, la interacción del oxígeno cargado negativamente con los nitrógenos amídicos en el hueco del oxianión, a menudo conocida como estabilización del estado de transición, también sirve en este caso para estabilizar el intermedio. No todos los intermedios tienen una vida corta de modo que se parezcan a los estados de transición. El intermedio acil-enzima de la quimotripsina es mucho más estable y se detecta y estudia mucho más fácilmente, por lo que nunca se confunde con el estado de transición.

RECUADRO 6–3 Pruebas de la complementariedad entre el enzima y el estado de transición

Es difícil estudiar el estado de transición de una reacción ya que, por definición, tiene una vida muy corta. No obstante, para llegar a comprender la catálisis enzimática hemos de estudiar a fondo la interacción entre el enzima y este momento efímero en el transcurso de una reacción. La idea de que un enzima es complementario al estado de transición es virtualmente un requisito para la catálisis, ya que la colina energética sobre la que se asienta el estado de transición es la que ha de rebajar el enzima para que se produzca la catálisis. ¿De qué modo podemos obtener pruebas de la complementariedad entre enzima y estado de transición?

Afortunadamente existen diversos métodos, viejos y nuevos, para afrontar este problema. Cada uno ha proporcionado pruebas convincentes a favor de este principio general de la acción enzimática.

Correlaciones estructura–actividad

Si los enzimas son complementarios al estado de transición de la reacción habrá algunos grupos funcionales en el sustrato y en el enzima que interaccionarán preferentemente en el estado de transición y no en el complejo ES. La alteración de estos grupos debería tener poco efecto sobre la formación del complejo ES y, por tanto, no deberían afectar los parámetros cinéticos (la constante de disociación, K_d; o a veces K_m, si $K_d = K_m$) que son reflejo del equilibrio E + S $\rightleftharpoons$ S. El cambio de estos mismos grupos habría de tener, sin embargo, un gran efecto sobre la velocidad global (k_{cat} o k_{cat}/K_m) de la reacción, ya que el sustrato ligado carece de potenciales interacciones de fijación necesarias para rebajar la energía de activación.

Un ejemplo excelente de este efecto se observa en las cinéticas asociadas con una serie de sustratos relacionados en el enzima quimotripsina (Fig. 1). La quimotripsina cataliza normalmente la hidrólisis de enlaces peptídicos próximos a aminoácidos aromáticos. Los sustratos que se muestran en la Figura 1 son modelos adecuados y más pequeños de los sustratos naturales (polipéptidos largos y proteínas). Los grupos químicos adicionales añadidos al pasar de A a B y a C están sombreados en rojo. Como muestra la tabla, la interacción entre el enzima y estos grupos funcionales añadidos tienen un efecto mínimo sobre K_m (que se considera aquí como un reflejo de K_d) pero un gran y positivo efecto sobre k_{cat} y k_{cat}/K_m. Esto es lo que cabría esperar si la interacción contribuyese en gran modo a la estabilización del estado de transición.

Los resultados demuestran también que la velocidad de una reacción puede estar muy afectada por interacciones entre enzima y sustrato que se producen en un sitio físicamente remoto a los enlaces covalentes que se alteran durante la reacción catalizada por el enzima. La quimotripsina se describe más detalladamente en el texto.

Un método experimental complementario consiste en la modificación del enzima eliminando ciertas interacciones enzima–sustrato mediante el reemplazo de aminoácidos específicos por mutagénesis dirigida (véase la Fig. 9–11). Los resultados que se derivan de estos experimentos demuestran otra vez la importancia de la energía de fijación en la estabilización del estado de transición.

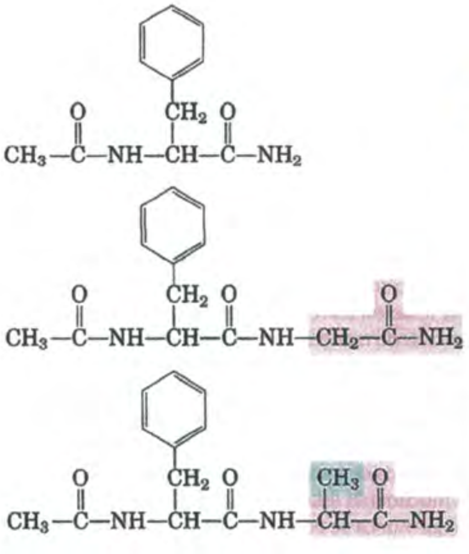
Análogos del estado de transición

A pesar de que los estados de transición no se pueden observar directamente, los químicos pueden predecir a menudo la estructura aproximada de un estado de transición basándose en conocimientos acumulados sobre los mecanismos de reacción. Por definición, el estado de transición es efímero y tan inestable que la medición directa de la interacción de fijación entre esta especie y el enzima es imposible. En algunos casos, no obstante, se pueden diseñar moléculas estables que se parezcan al estado

Sustrato A

Sustrato B

Sustrato C



k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
0,06	31	2
0,14	15	10
2,8	25	114

FIGURA 1 Efecto de pequeños cambios estructurales en el sustrato sobre los parámetros cinéticos de la hidrólisis de amidas catalizada por la quimotripsina.

de transición y que se denominan **análogos del estado de transición.** En principio, deberían unirse a un enzima más fuertemente de lo que se une el sustrato en el complejo ES ya que deberían encajar mejor en el sitio activo (es decir, formarían más interacciones débiles) que el propio sustrato. La idea de los análogos del estado de transición fue sugerida por Pauling en la década de 1940 y se ha utilizado para diversos enzimas. Estos experimentos están limitados por el hecho de que un análogo del estado de transición nunca puede reproducir perfectamente un estado de transición. No obstante, se han encontrado análogos que se fijan al enzima de 10^2 a 10^6 veces más fuertemente que el sustrato normal lo que constituye una buena prueba de que los sitios activos de los enzimas son, realmente, complementarios a sus estados de transición. El mismo principio se utiliza actualmente en la industria farmacéutica para el diseño de nuevos fármacos. Los potentes fármacos anti-VIH denominados inhibidores de la proteasa se diseñaron en parte como análogos de unión fuerte al estado de transición dirigidos al sitio activo de la proteasa del VIH.

Anticuerpos catalíticos

Si se puede diseñar un análogo al estado de transición de la reacción S → P, un anticuerpo que se una fuertemente al análogo del estado de transición debería catalizar S → P. Los anticuerpos (inmunoglobulinas; véase la Fig. 5–21) son componentes clave de la respuesta inmune. Cuando se utiliza un análogo del estado de transición como un epitopo unido a una proteína para estimular la producción de anticuerpos, los anticuerpos que lo fijen serán catalizadores potenciales de la reacción correspondiente. El uso de los "anticuerpos catalíticos", sugerido originalmente por William P. Jencks en 1969, se ha podido llevar a la práctica gracias al desarrollo de técnicas de laboratorio para la producción de cantidades suficientes de anticuerpos idénticos que se fijan a un antígeno específico (anticuerpos monoclonales, p. 173).

Los trabajos pioneros en los laboratorios de Richard Lerner y de Peter Schultz han llevado al aislamiento de una serie de anticuerpos monoclonales que catalizan la hidrólisis de ésteres o carbonatos (Fig. 2). En estas reacciones, el ataque del agua (OH^-) sobre el carbono carbonílico produce un estado de transición tetraédrico en el que aparece una carga negativa parcial sobre el oxígeno carbonílico. Los compuestos éster fosfonato mimetizan la estructura y la distribución de carga de este estado de transición en la hidrólisis de ésteres, por lo que son buenos análogos del estado de transición; en las reacciones de hidrólisis de carbonatos se utilizan compuestos éster fosfato. Se ha encontrado que los anticuerpos que se unen fuertemente a compuestos tipo fosfonato o fosfato aceleran las correspondientes reacciones de hidrólisis de ésteres o carbonatos con factores de incremento de velocidad de 10^3 a 10^4. El análisis estructural de algunos de estos anticuerpos catalíticos ha demostrado que algunas cadenas laterales de los aminoácidos catalíticos están dispuestas de tal forma que pueden interaccionar con el sustrato en el estado de transición.

Los anticuerpos catalíticos no se acercan generalmente a la eficacia catalítica de los enzimas, pero a pesar de eso aparecen sus aplicaciones médicas e industriales. Por ejemplo, se está investigando si los anticuerpos catalíticos diseñados para degradar cocaína podrían ser útiles en el tratamiento de la adicción a esta droga.

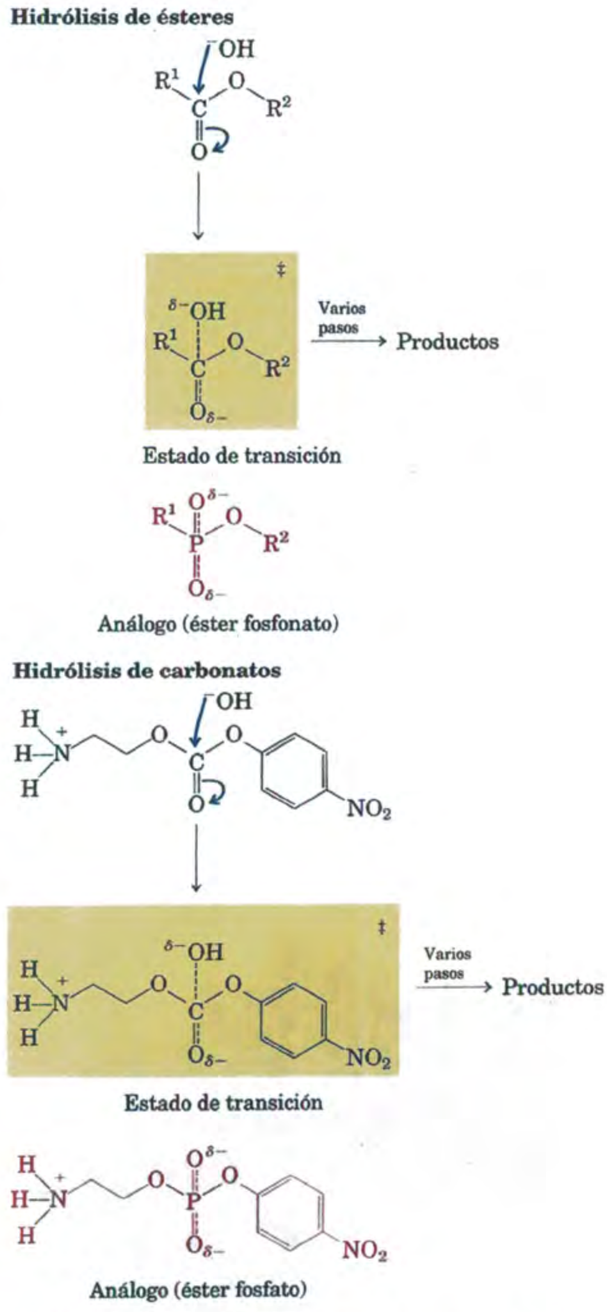
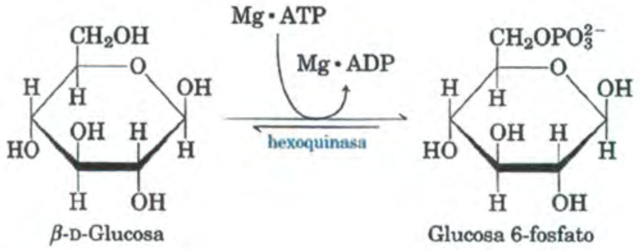


FIGURA 2 Estados de transición esperados para las reacciones de hidrólisis de ésteres y de carbonatos. Los compuestos éster fosfonato y éster fosfato constituyen, respectivamente, buenos análogos del estado de transición de estas reacciones.

En la hexoquinasa se produce un encaje inducido durante la unión del sustrato

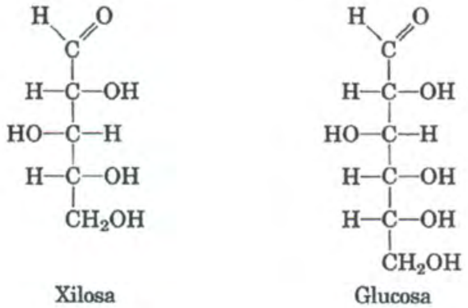
La hexoquinasa de levadura (M_r 107.862) es un enzima bisustrato que cataliza la reacción reversible



El ATP y el ADP se unen siempre al enzima formando un complejo con el ión metálico de Mg^{2+}.

El hidroxilo en la posición C-6 de la molécula de glucosa (al cual se transfiere el γ-fosfato del ATP durante la reacción de la hexoquinasa) es similar en reactividad química al agua, la cual penetra libremente en el sitio activo de la glucosa. No obstante, la hexoquinasa discrimina entre la glucosa y el agua de forma favorable a la glucosa en un factor de 10^6. El enzima puede discriminar entre la glucosa y el agua gracias a un cambio de conformación que se produce en el enzima cuando se une el sustrato correcto **(Fig. 6–22)**. La hexoquinasa constituye, por tanto, un buen ejemplo de encaje inducido. Cuando no hay glucosa, el enzima se encuentra en una conformación inactiva, con las cadenas laterales de los aminoácidos del sitio activo en una posición no adecuada para la reacción. Cuando se fijan la glucosa (pero no el agua) y Mg · ATP, la energía de fijación que se produce en esta interacción induce un cambio hacia la conformación catalíticamente activa del enzima.

Los estudios cinéticos han reforzado esta conclusión. El azúcar de cinco carbonos xilosa, similar estereoquímicamente a la glucosa pero con un carbono menos, se une a la hexoquinasa, pero lo hace en una posición donde no puede ser fosforilada. Sin embargo, la adición de xilosa a la mezcla de reacción aumenta la velocidad de hidrólisis de ATP. Evidentemente, la fijación de xilosa es suficiente para inducir un cambio en la hexoquinasa a su conformación activa, por lo que el enzima resulta "engañado" para que fosforile agua. La reacción de la hexoquinasa también ilustra que la especificidad del enzima no siempre es un simple problema de fijación de un compuesto en lugar de otro. En el caso de la hexoquinasa, se observa especificidad no en la formación del complejo ES, sino en las velocidades relativas de las siguientes etapas catalíticas. El agua no es excluida del sitio activo, pero las velocidades de reacción aumentan considerablemente en presencia de grupos aceptores de fosforilo funcionales (glucosa).



El encaje inducido sólo es un aspecto del mecanismo catalítico de la hexoquinasa; al igual que la quimotripsina, la hexoquinasa utiliza diversas estrategias catalíticas. Por ejemplo, los residuos aminoácidos del sitio activo (los que se posicionan mediante el cambio de conformación que sigue a la fijación del sustrato) participan en la catálisis ácido-base general y en la estabilización del estado de transición.

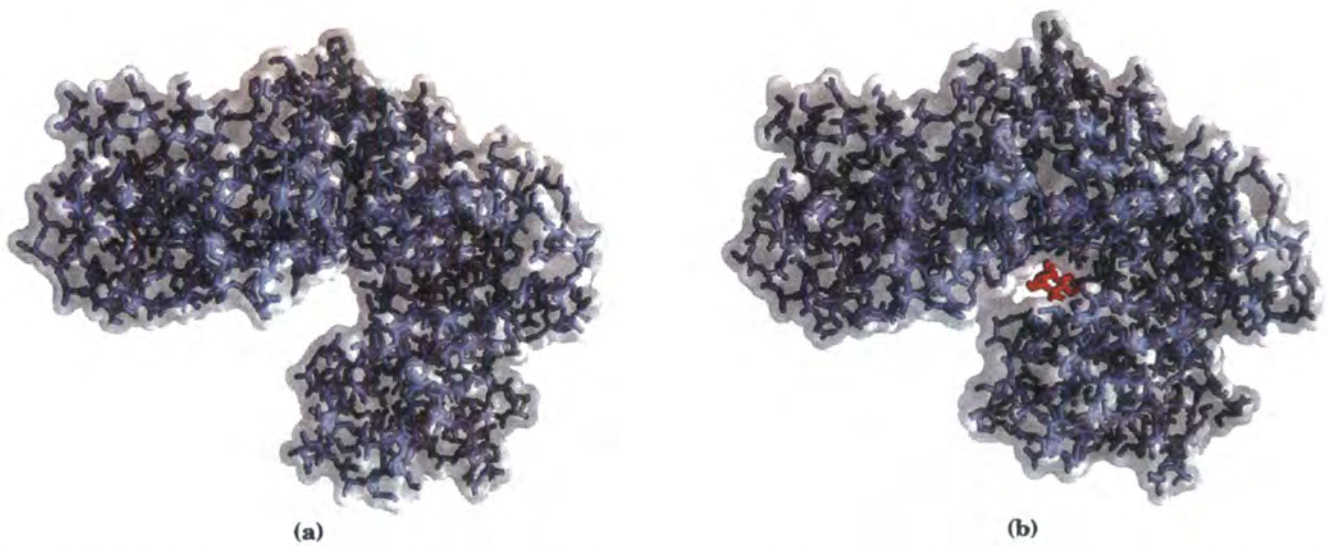
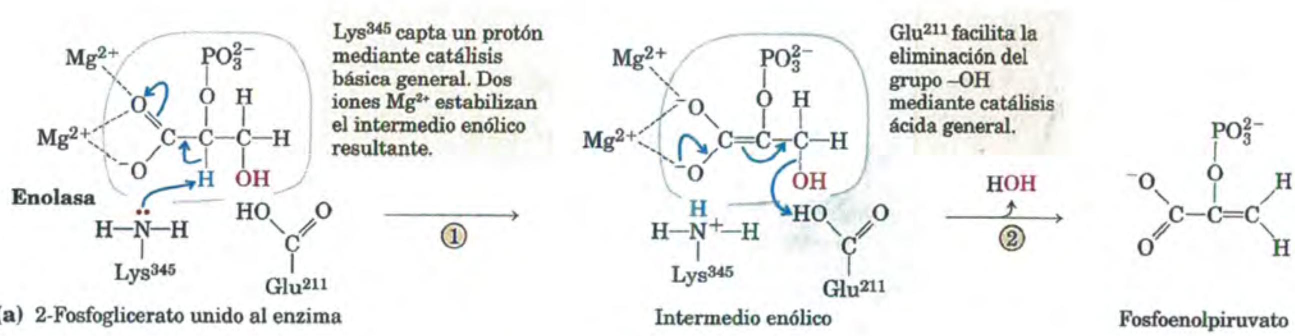


FIGURA 6–22 Encaje inducido en la hexoquinasa. **(a)** La hexoquinasa tiene una estructura en forma de U (PDB ID 2YHX). **(b)** Los extremos se acercan en un cambio de conformación inducido por la unión de la D-glucosa (en rojo) (de PDB ID 1HKG y PDB ID 1GLK).



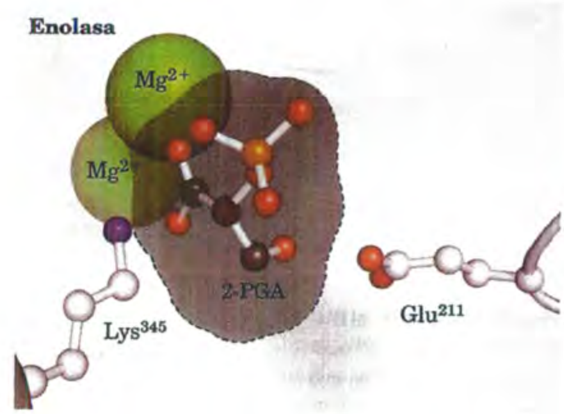
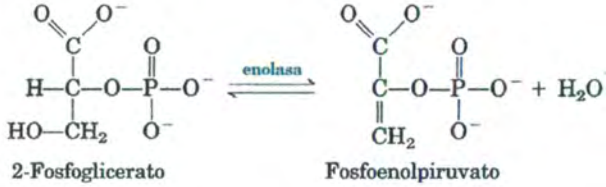


FIGURA DE MECANISMO 6–23 Reacción en dos pasos catalizada por la enolasa. (a) Mecanismo mediante el que se convierte el 2-fosfoglicerato (2-PGA) en fosfoenolpiruvato por la enolasa. El grupo carboxilo del 2-PGA está coordinado por dos iones magnesio en el sitio activo. **(b)** El sustrato, 2-PGA, en relación a los iones magnesio, Lys^{345} y Glu^{211} en el sitio activo de la enolasa. El nitrógeno se muestra en azul y el fósforo en naranja; no se muestran los átomos de hidrógeno (PDB ID 1ONE).

El mecanismo de reacción de la enolasa requiere la presencia de iones metálicos

Otro enzima glucolítico, la enolasa, cataliza la deshidratación reversible del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato:



2-Fosfoglicerato — Fosfoenolpiruvato

La enolasa de levadura (M_r 93.316) es un dímero con 436 residuos aminoácidos por subunidad. La reacción de la enolasa ilustra un tipo de catálisis por ión metálico y proporciona un ejemplo adicional de catálisis ácido-base general y de estabilización del estado de transición. La reacción tiene lugar en dos etapas **(Fig. 6–23a)**. En primer lugar, el residuo Lys^{345} actúa como un catalizador básico general, sustrayendo un protón del C-2 del 2-fosfoglicerato; a continuación, el Glu^{211} actúa como un catalizador ácido general, cediendo un protón al grupo –OH saliente. El protón en el C-2 del 2-fosfoglicerato no es muy ácidico, por lo que no se extrae fácilmente. Sin embargo, en el sitio activo del enzima, el 2-fosfoglicerato experimenta interacciones iónicas fuertes con dos iones Mg^{2+} unidos (Fig. 6–23b), que convierten al protón del C-2 en más acídico (disminuye su pK_a), lo que hace más fácil su extracción. Enlaces de hidrógeno con otros residuos aminoácidos del sitio activo también contribuyen al mecanismo global. Las diversas interacciones estabilizan efectivamente tanto el intermedio enolato como el estado de transición que precede a su formación.

La lisozima utiliza dos reacciones de desplazamiento nucleofílico sucesivas

La lisozima es un agente antibacteriano natural que se encuentra en las lágrimas y en la clara del huevo. La lisozima de clara de huevo de gallina (M_r 14.296) es un monómero de 129 aminoácidos. Fue el primer enzima del que se determinó la estructura tridimensional, a cargo de David Phillips y colaboradores en 1965. En la estructura se observan cuatro enlaces disulfuro estabilizadores y una hendidura que contiene el sitio activo **(Fig. 6–24a)**. Más de cinco décadas de investigación sobre la lisozima han permitido obtener una imagen detallada sobre la estructura y la actividad del enzima, además de una interesante historia sobre el progreso de la ciencia bioquímica.

El sustrato de la lisozima es una molécula de péptidoglucano, un glúcido que se encuentra en muchas paredes bacterianas (véase la Fig. 20–31). La lisozima rompe el enlace glucosídico C—O ($\beta1\rightarrow4$) (véase la p. 243) entre los dos tipos de azúcares de la molécula, el ácido *N*-acetilmurámico (Mur2Ac) y la *N*-ace-

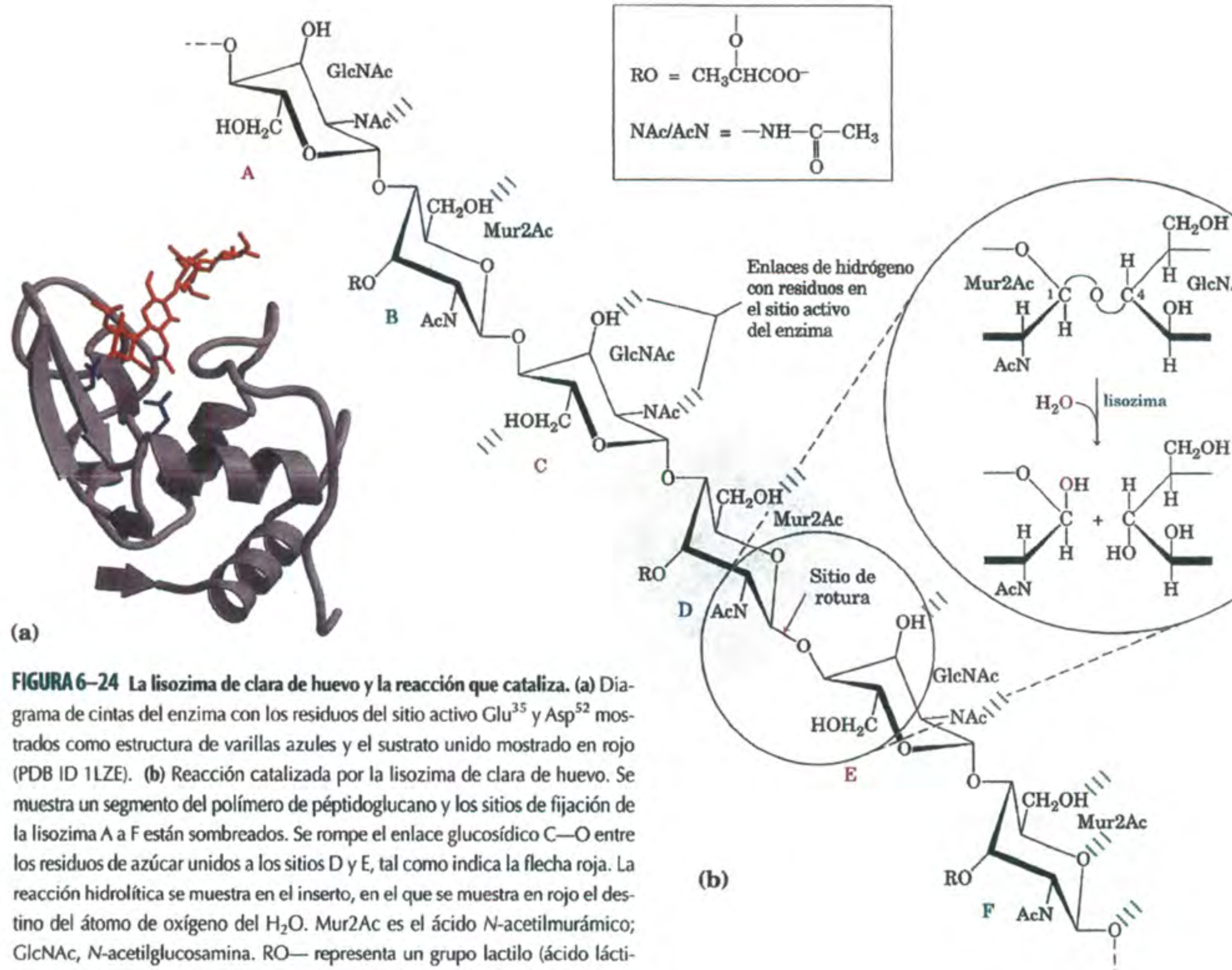


FIGURA 6–24 La lisozima de clara de huevo y la reacción que cataliza. **(a)** Diagrama de cintas del enzima con los residuos del sitio activo Glu^{35} y Asp^{52} mostrados como estructura de varillas azules y el sustrato unido mostrado en rojo (PDB ID 1LZE). **(b)** Reacción catalizada por la lisozima de clara de huevo. Se muestra un segmento del polímero de péptidoglucano y los sitios de fijación de la lisozima A a F están sombreados. Se rompe el enlace glucosídico C—O entre los residuos de azúcar unidos a los sitios D y E, tal como indica la flecha roja. La reacción hidrolítica se muestra en el inserto, en el que se muestra en rojo el destino del átomo de oxígeno del H_2O. Mur2Ac es el ácido *N*-acetilmurámico; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina. RO— representa un grupo lactilo (ácido láctico); —NAc y AcN—, un grupo *N*-acetilo (ver la clave en el recuadro)

tilglucosamina (GlcNAc), frecuentemente denominados NAM y NAG, respectivamente, en la literatura científica sobre enzimología (Fig. 6–24b). Seis residuos alternos de Mur2Ac y GlcNAc del péptidoglucano se unen al sitio activo en los sitios de unión marcados con las letras A a F. La construcción de modelos moleculares ha mostrado que la cadena lateral lactilo de Mur2Ac no puede acomodarse en los sitios C y E, por lo que su unión se restringe a los sitios B, D y F. Sólo se rompe uno de los enlaces glucosídicos unidos, el que se encuentra entre un residuo Mur2Ac en el sitio D y un residuo GlcNAc en el sitio E. Los aminoácidos catalíticos clave del sitio activo son Glu^{35} y Asp^{52} **(Fig. 6–25a)**. La reacción es una sustitución nucleofílica en la que un —OH del agua reemplaza a GlcNAc en la posición C-1 de Mur2Ac.

Después de la identificación de los residuos del sitio activo y de la obtención de la estructura detallada del enzima, en la década de 1960 parecía que el camino hacia la comprensión del mecanismo de reacción quedaba expedito. Sin embargo, durante cuatro décadas no fue posible obtener pruebas definitivas a favor de ningún mecanismo determinado. Existen dos mecanismos químicamente razonables que podrían dar lugar a los productos observados en la rotura de enlaces glucosídicos mediada por la lisozima. Phillips y colaboradores propusieron un mecanismo disociativo (de tipo S_N1) (Fig. 6–25a, izquierda), en el que se produce en primer lugar la disociación de GlcNAc en el paso ①, dejando un intermedio catión glucosilo (un carbocatión). En este mecanismo, la GlcNAc saliente es protonada mediante catálisis ácida general por el Glu^{35}, localizado en una bolsa hidrofóbica que le confiere un pK_a inusualmente elevado a su grupo carboxilo. El carbocatión se estabiliza por resonancia con el oxígeno del anillo adyacente y mediante interacción electrostática con la carga negativa del Asp^{52} cercano. En el paso ②, una molécula de agua ataca el C-1 de Mur2Ac para dar el producto. El mecanismo alternativo (Fig. 6–25a, derecha) supone dos pasos de desplazamiento directo (del tipo S_N2) consecutivos. En el paso ①, el Asp^{52} ataca el C-1 de Mur2Ac y desplaza la GlcNAc. Al igual que en el primer mecanismo, el Glu^{35} actúa como ácido general protonando la GlcNAc saliente. En el paso ②, una molécula de agua ataca al C-1 de Mur2Ac, desplazando al Asp^{52} y generando el producto.

El mecanismo de Phillips (S_N1) fue ampliamente aceptado durante más de tres décadas. Sin embargo, siguió existiendo cierta controversia y continuaron los experimentos. A veces, el método científico hace que se adelante lentamente en algunos temas por lo que puede ser difícil diseñar un experimento realmente esclarecedor. Algunos de los primeros argumentos desfavorables al mecanismo de Phillips eran sugerentes pero no totalmente persuasivos. Por ejemplo, se suponía que la vida media del catión glucosilo propuesto en el mecanismo era de 10^{-12} segundos, justo un poco mayor que una vibración molecu-

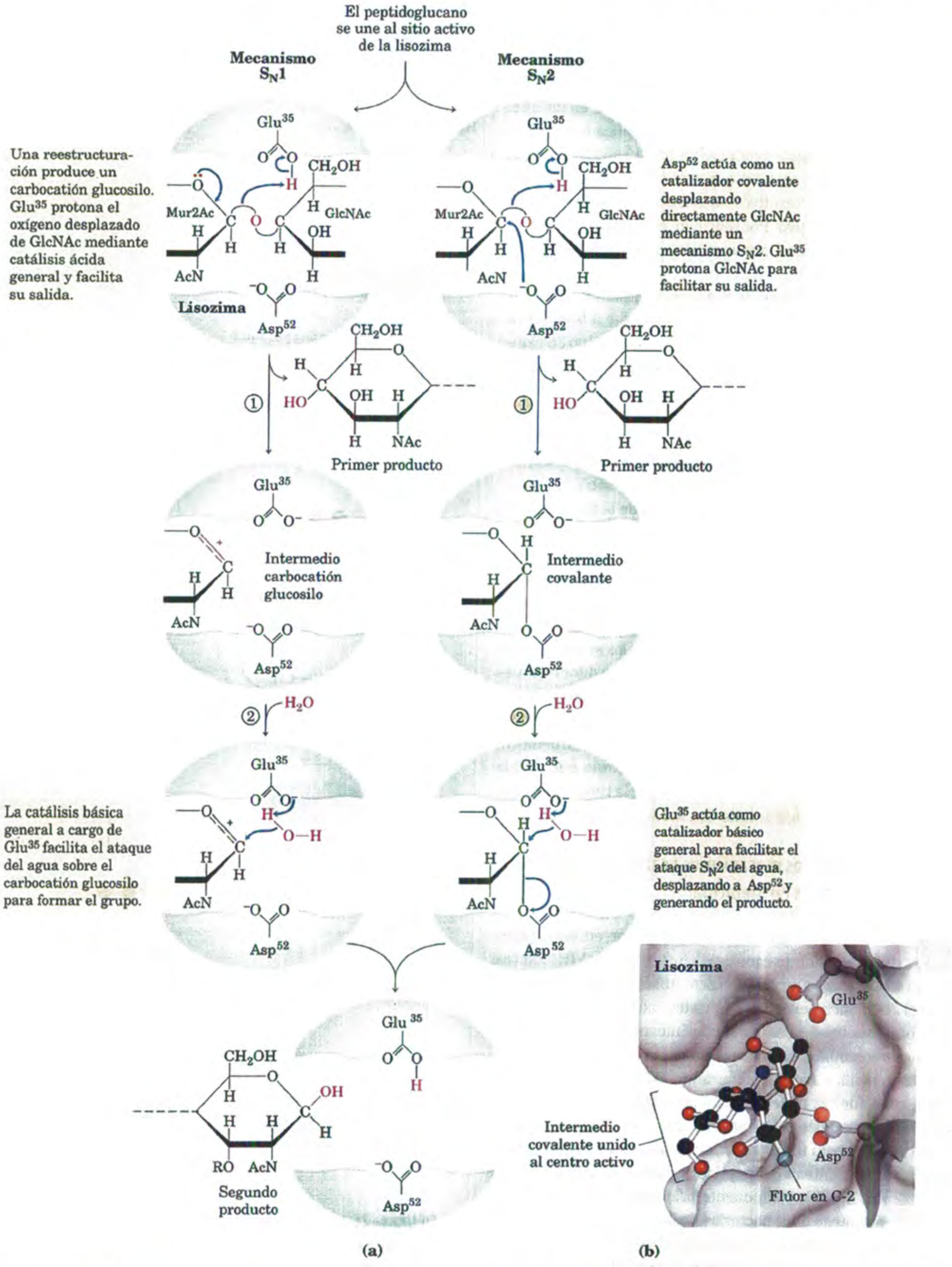


FIGURA DE MECANISMO 6–25 Reacción de la lisozima. En esta reacción (descrita en el texto), el agua introducida en el producto en C-1 de Mur2Ac está en la misma configuración que el enlace glucosídico original. La reacción es, por tanto, una sustitución molecular con retención de configuración. **(a)** Dos mecanismos propuestos explican potencialmente la reacción global y sus propiedades. La ruta S_N1 (izquierda) es el mecanismo original de Phillips. La ruta S_N2 (derecha) es el mecanismo más consistente con los datos actuales. **(b)** Representación de la superficie del centro activo de la lisozima con el intermedio covalente enzima–sustrato mostrado como estructura de bolas y varillas. Las cadenas laterales de los residuos del sitio activo se muestran en estructura de bolas y varillas que sobresalen de las cintas del diagrama (PDB ID 1H6M).

lar y no lo suficientemente larga como para permitir la necesaria difusión de otras moléculas. Más importante todavía, la lisozima es un miembro de la familia de enzimas que actúan con "retención de la configuración", y que catalizan reacciones en las que el producto tiene la misma configuración anomérica que el sustrato (las configuraciones anoméricas de los glúcidos se examinan en el Capítulo 7); se sabe que estos enzimas presentan intermedios covalentes reactivos tales como el propuesto en el mecanismo S_N2 alternativo. Por todo ello, el mecanismo de Phillips contradecía los datos experimentales de enzimas estrechamente relacionados.

Un experimento a cargo de Stephen Whithers y colaboradores en 2001 escoró la discusión decididamente a favor de la ruta S_N2. Utilizando un enzima mutante (con el residuo 35 cambiado de Glu a Gln) y sustratos artificiales para que, combinados, dieran lugar a un descenso en la velocidad de los pasos clave de la reacción, estos investigadores fueron capaces de estabilizar el elusivo intermedio covalente. Ello les permitió a la vez observar el intermedio directamente mediante espectrometría de masas y cristalografía de rayos X (Fig. 6–25b).

¿Puede considerarse que el mecanismo de la lisozima está ya demostrado? No. Un aspecto clave del método científico, como argumentó Albert Einstein en una ocasión, es que "no puede haber experimentos suficientes para demostrar que estoy en lo cierto; en cambio, un solo experimento puede demostrar que estoy equivocado". En el caso del mecanismo de la lisozima se podría argumentar, como ya se ha hecho, que los sustratos artificiales con los carbonos C-1 y C-2 sustituidos con flúor que fueron utilizados para estabilizar el intermedio covalente podrían haber alterado el camino de la reacción. La elevada electronegatividad del flúor podría desestabilizar un ión oxicarbenio ya electrodeficiente en el intermedio catión glucosilo que podría aparecer en el mecanismo S_N1. Sin embargo, la ruta S_N2 es, por ahora, el mecanismo más acorde con los datos disponibles.

La comprensión de los mecanismos enzimáticos impulsa importantes avances en medicina

Los fármacos que se usan para tratar enfermedades, desde el dolor de cabeza a la infección por VIH, son casi siempre inhibidores enzimáticos. Aquí se exploran dos ejemplos: el antibiótico penicilina (y sus derivados) y los inhibidores de la proteasa usados para tratar las infecciones por VIH, todos los cuales son inhibidores irreversibles.

La penicilina fue descubierta en 1928 por Alexander Fleming, pero fueron necesarios 15 años más para comprender bien este compuesto relativamente inestable y poder utilizarlo como fármaco para tratar infecciones bacterianas. La penicilina interfiere en la síntesis del peptidoglucano (descrita en el Capítulo 20, Fig. 20–32), componente principal de la pared celular rígida que protege a las bacterias de la lisis osmótica. El peptidoglucano está formado por polisacáridos y péptidos entrelazados mediante diversos pasos que incluyen una reacción a cargo de una transpeptidasa (**Fig. 6–26**). Ésta es la reacción inhibida por la penicilina y otros compuestos relacionados (**Fig. 6–27**), todos los cuales mimetizan una conformación del segmento D-Ala—D-Ala del precursor del peptidoglucano. El enlace peptídico del precursor es reemplazado por un anillo de β-lactama, altamente reactivo. Cuando la penicilina se une a la traspepti-

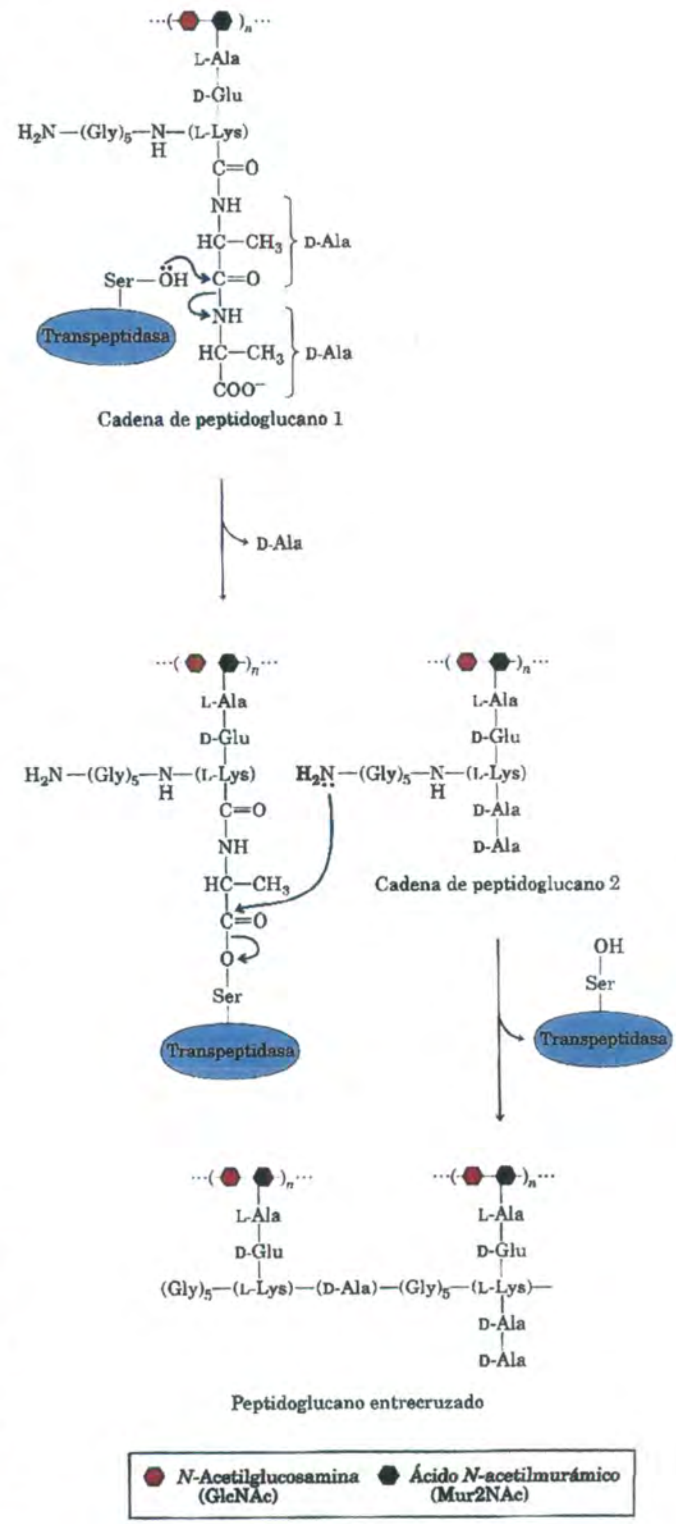
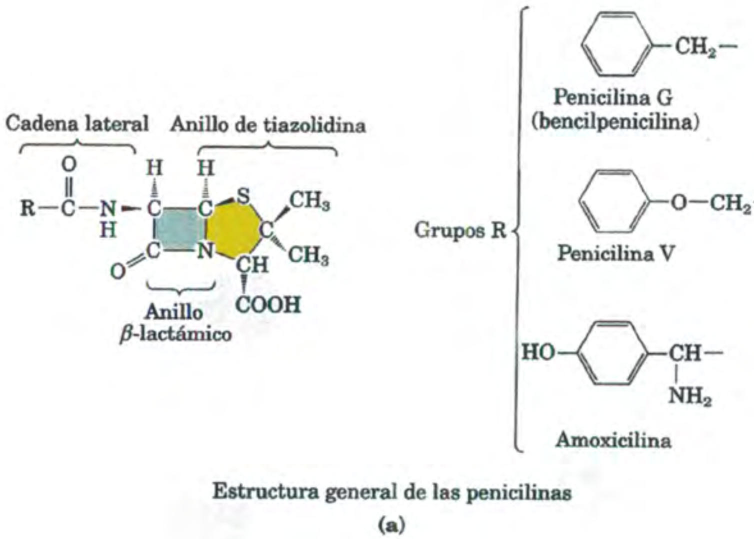


FIGURA 6–26 Reacción de la transpeptidasa. Esta reacción, que une dos precursores de peptidoglucano en un gran polímero, está facilitada por una Ser del sitio activo y un mecanismo de catálisis covalente similar al de la quimotripsina. Observe que el peptidoglucano es una de las pocas moléculas naturales que presentan D-aminoácidos. La Ser del sitio activo ataca el carbonilo del enlace peptídico entre los dos residuos D-Ala, creando un enlace éster covalente entre el sustrato y el enzima y la liberación del residuo D-Ala terminal. Un grupo amino del segundo precursor de peptidoglucano ataca a continuación este enlace éster, desplazando el enzima y uniendo los dos precursores.



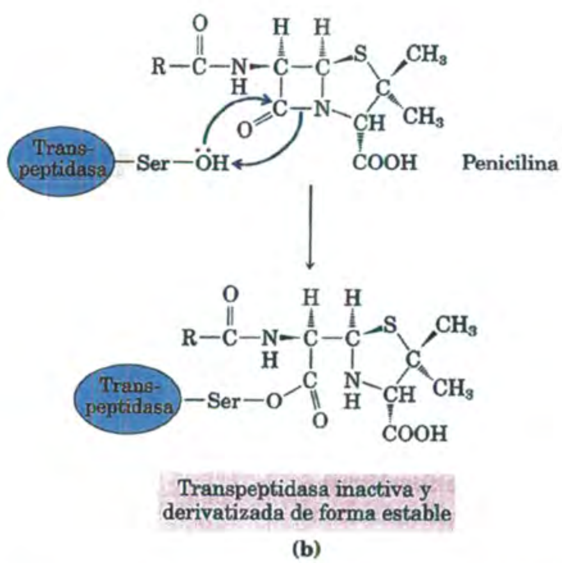
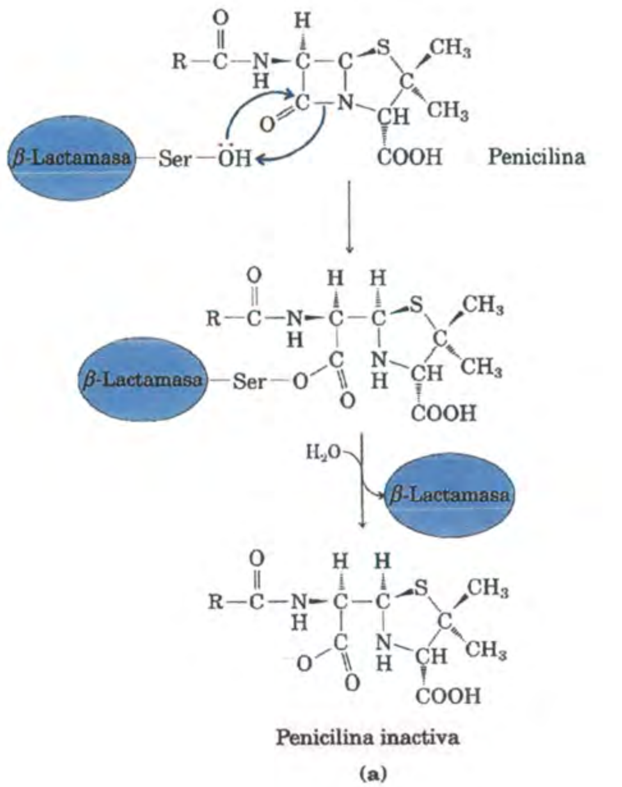


FIGURA 6–27 Inhibición de la transpeptidasa por antibióticos β-lactámicos. (a) Los antibióticos β-lactámicos tienen un anillo de tiazolidina de cinco átomos fusionado a otro anillo β-lactámico de cuatro átomos. Este último está tenso e incluye un grupo amida que juega un papel central en la inactivación de la síntesis de peptidoglucanos. El grupo R varía según el tipo de penicilina. La penicilina G fue la primera en ser aislada y sigue siendo una de las más efectivas, pero se degrada por el ácido del estómago y debe administrarse mediante una inyección. La penicilina V es casi tan efectiva y es estable en condiciones ácidas por lo que se puede administrar por vía oral. La amoxicilina tiene un rango de efectividad amplio, se administra oralmente y es el antibiótico β-lactámico más prescrito. (b) El ataque sobre la parte amida del anillo β-lactámico por una Ser del sitio activo de la transpeptidasa da lugar a un producto covalente acil-enzima. Éste se hidroliza tan lentamente que la formación del aducto es prácticamente irreversible, con lo que la transpeptidasa permanece inactivada.

dasa, una Ser del sitio activo ataca el grupo carbonilo del anillo de β-lactama y genera un aducto covalente entre la penicilina y el enzima. Sin embargo, el grupo saliente permanece unido porque está enlazado mediante lo que resta del anillo de β-lactama (Fig. 6–27b). El complejo covalente inactiva el enzima irreversiblemente. Ello da lugar, a su vez, al bloqueo de la síntesis de la pared celular bacteriana, y la mayoría de bacterias mueren a causa de la rotura de la frágil membrana interna a causa de la presión osmótica.

El uso de la penicilina y sus derivados por parte del ser humano ha dado lugar a la evolución de especies de bacterias patógenas que expresan **β-lactamasas (Fig. 6–28a)**, enzimas que rompen antibióticos β-lactámicos inactivándolos. De esta manera, las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos. Los genes de estos enzimas se han distribuido muy rápidamente entre la población bacteriana sometida a la presión selectiva impuesta por el uso (y a veces abuso) de los antibióticos β-lactámicos. La medicina humana respondió con el desarrollo de compuestos tales como el ácido clavulánico, un inactivador suicida que inactiva irreversiblemente las β-lactamasas (Fig. 6–28b). El ácido clavulánico mimetiza la estructura de un antibiótico β-lactámico y forma un aducto covalente con una Ser del sitio activo de la β-lactamasa. Ello da lugar a una reestructuración que genera un derivado mucho más reactivo que, a su vez, es atacado a continuación por otro nucleófilo del sitio activo que da lugar a una acilación irreversible



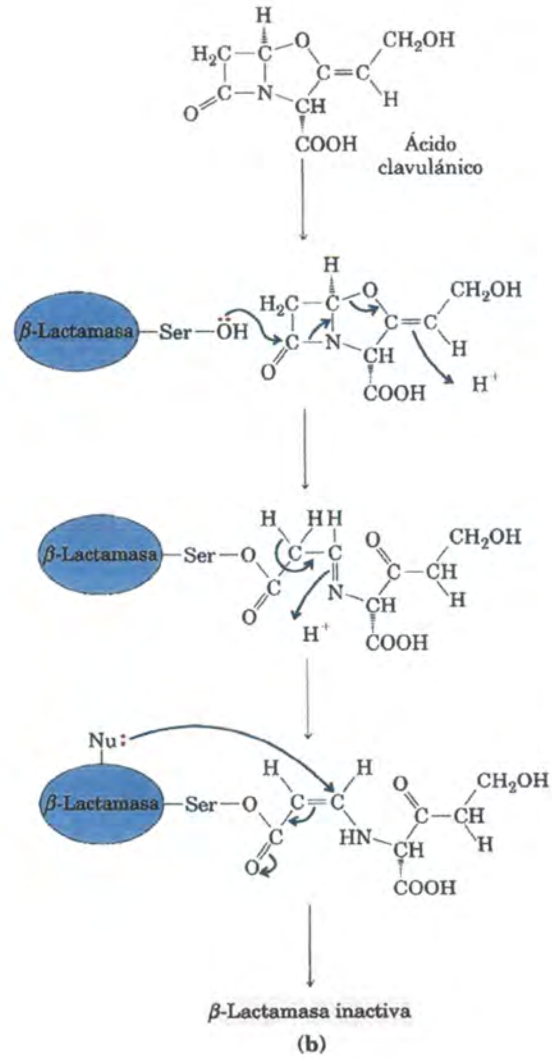


FIGURA 6–28 β–Lactamasas e inhibición de la β-lactamasa. **(a)** Las β-lactamasas promueven la rotura del anillo β-lactama en los antibióticos β-lactámicos, inactivándolos. **(b)** El ácido clavulánico es un inhibidor suicida que utiliza el mecanismo químico normal de las β-lactamasas para crear una especie reactiva en el centro activo. La especie reactiva es atacada por grupos del sitio activo con el resultado de la acilación irreversible del enzima.

del enzima inactivándolo. La amoxicilina y el ácido clavulánico se combinan en una formulación farmacéutica de uso generalizado llamada Augmentine. El ciclo de guerra química entre el ser humano y las bacterias continúa sin descanso. Se han descubierto ya cepas de bacterias patógenas resistentes tanto a la amoxicilina como al ácido clavulánico (lo que refleja la existencia de mutaciones en la **β**-lactamasa que le impiden reaccionar con el ácido clavulánico). El desarrollo de nuevos antibióticos será muy probablemente una industria en crecimiento en el próximo futuro.

Los agentes antivíricos constituyen otro ejemplo del desarrollo moderno de fármacos. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, o sida. En 2005 se calculó que había entre 37 y 45 millones de personas en el mundo que vivían infectadas por el VIH, que las infecciones nuevas fueron ese año de entre 3,9 y 6,6 millones y que hubo más de 2,4 millones de muertos. La aparición del sida se produjo como epidemia mundial en la década de 1980; poco después se descubrió el VIH, que fue identificado como un **retrovirus.** Los retrovirus poseen un genoma de RNA y un enzima, la transcriptasa inversa, capaz de usar el RNA para dirigir la síntesis de un DNA complementario. Los esfuerzos de décadas de investigación básica con retrovirus sirvieron para comprender el VIH y diseñar estrategias terapéuticas contra la infección por VIH. Un retrovirus tal como el VIH tiene un ciclo vital relativamente simple (véase la Fig. 26–23). Su genoma de RNA se convierte en DNA dúplex en diversos pasos catalizados por una transcriptasa inversa (descrita en el Capítulo 26). A continuación el DNA dúplex se inserta en un cromosoma del núcleo de la célula huésped mediante el enzima integrasa (descrito en el Capítulo 25). La copia integrada del genoma vírico puede permanecer en estado latente por tiempo indefinido. Alternativamente, puede transcribirse en forma de RNA, el cual puede ser traducido a proteínas que sirven para construir nuevas partículas víricas. La mayor parte de los genes víricos se traduce en forma de grandes poliproteínas, que son cortadas por la proteasa del VIH generando las proteínas individuales necesarias para construir el virus (Fig. 26–34). En este ciclo tan solo hay tres enzimas clave —la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa— que son, por tanto, dianas farmacológicas potenciales.

Existen cuatro subclases principales de proteasas. Las serina proteasas, tales como la quimotripsina y la tripsina y las cisteína proteasas (en las que una Cys juega un papel catalítico parecido al de la Ser en el sitio activo) forman complejos covalentes enzima–sustrato; las aspartil proteasas y las metaloproteasas no lo hacen. La proteasa del VIH es una aspartil proteasa. Dos residuos

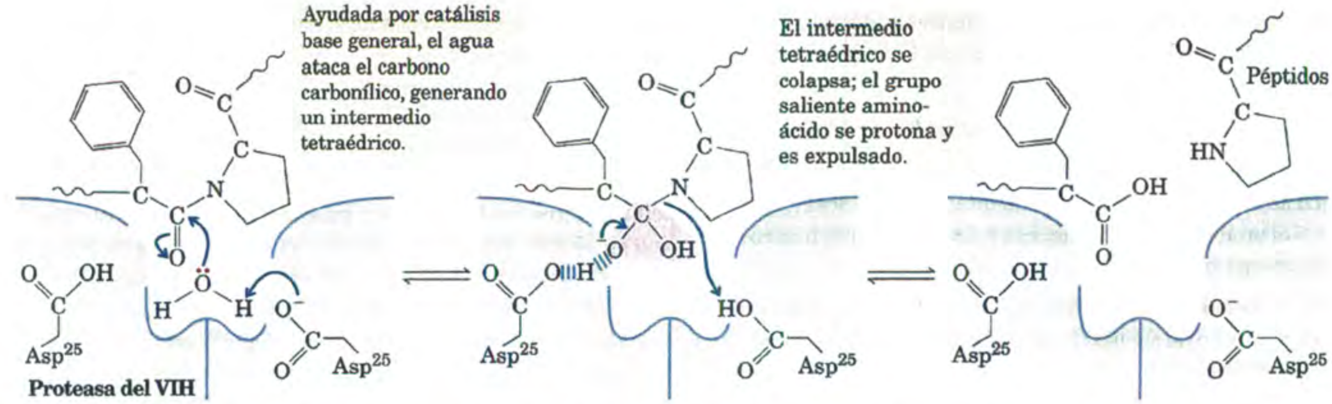
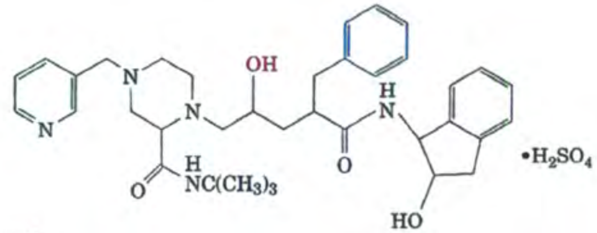
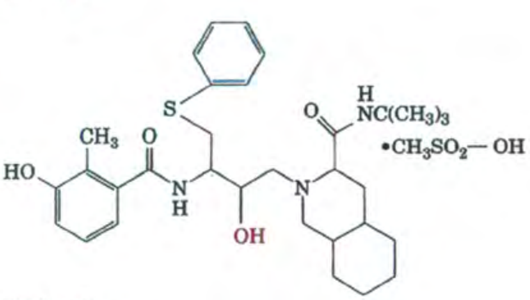


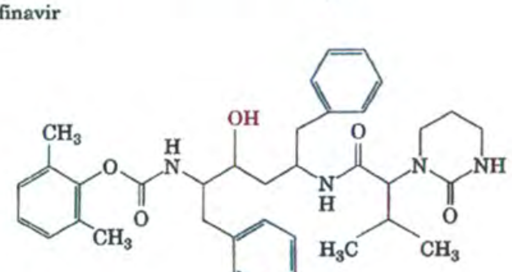
FIGURA 6–29 Mecanismo de acción de la proteasa del VIH. Dos residuos Asp del sitio activo (pertenecientes a subunidades distintas) actúan de catalizadores ácido-base generales, facilitando el ataque del agua sobre el enlace peptídico. El intermedio tetraédrico inestable de la reacción se muestra en color rosa.

Asp en el sitio activo facilitan el ataque directo del agua sobre el enlace peptídico a hidrolizar **(Fig. 6–29)**. El producto inicial del ataque del agua sobre el grupo carbonilo del enlace peptídico es un intermedio tetraédrico inestable, muy parecido al que hemos visto en la reacción de la quimotripsina. Este intermedio es parecido en estructura y energía al estado de transición de la reacción. Los medicamentos desarrollados como inhibidores de la proteasa del VIH forman complejos no covalentes con el enzima, pero se unen a él tan fuertemente que pueden ser considerados inhibidores irreversibles. Esta fuerte unión es, en parte, resultado de su diseño como análogos del estado de transición (véase el Recuadro 6–3). El éxito de estos fármacos hace que convenga poner énfasis en un punto. Los principios catalíticos que hemos estudiado en este capítulo no son simples ideas abstrusas que haya que memorizar; su aplicación salva vidas.

La proteasa del VIH hidroliza con eficiencia máxima enlaces peptídicos entre Phe y Pro. El sitio activo tiene, por tanto, una bolsa que une grupos aromáticos al lado del enlace a romper. En la **Figura 6–30** se muestran las estructuras de varios inhibidores de la proteasa del VIH. A pesar de sus diferentes estructuras, todos ellos comparten una estructura básica: una cadena principal con un grupo hidroxilo situado al lado de una ramificación que contiene un grupo bencilo. Esta estructura dirige el grupo bencilo hacia la bolsa de unión aromática. El grupo hidroxilo adyacente mimetiza el oxígeno cargado negativamente del intermedio tetraédrico de la reacción normal, dando lugar a un análogo del estado de transición. El resto de cada una de las estructuras de los inhibidores se diseñó para encajar en las diversas hendiduras de la superficie del enzima, con el fin de aumentar la capacidad global de unión. La disponibilidad de estos medicamentos efectivos ha incrementado en gran medida la esperanza y la calidad de vida de millones de personas afectadas por el VIH y el sida. ■


Indinavir


Nelfinavir


Lopinavir

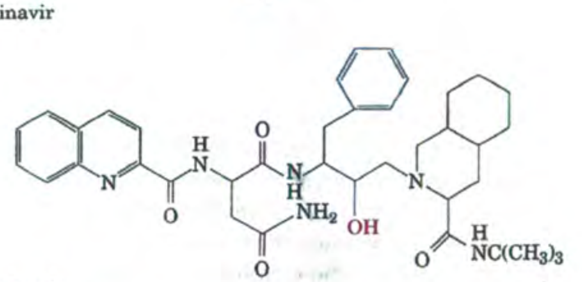

Saquinavir

FIGURA 6–30 Inhibidores de la proteasa del VIH. El grupo hidroxilo (rojo) actúa como un análogo del estado de transición, mimetizando el oxígeno del intermedio tetraédrico. El grupo bencilo adyacente (azul) ayuda a colocar adecuadamente el fármaco en el centro activo.

RESUMEN 6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas

- La quimotripsina es una serina proteasa con un mecanismo bien conocido que comprende catálisis ácido-base general, catálisis covalente y estabilización del estado de transición.

- La hexoquinasa proporciona un ejemplo excelente del encaje inducido como medio para explotar la energía de fijación del sustrato.
- La reacción de la enolasa tiene lugar mediante catálisis por ión metálico.
- La lisozima utiliza catálisis covalente y catálisis ácida general al promover dos reacciones de desplazamiento nucleofílico sucesivas.
- El conocimiento de los mecanismos enzimáticos permite el desarrollo de algunos fármacos inhibidores de la acción enzimática.

6.5 Enzimas reguladores

En el metabolismo celular hay grupos de enzimas que funcionan conjuntamente en rutas secuenciales para llevar a cabo un proceso metabólico determinado, tal como la conversión, en varias reacciones, de la glucosa en lactato o la síntesis a través de diversas reacciones de un aminoácido a partir de precursores sencillos. En tales sistemas enzimáticos, el producto de la reacción del primer enzima se convierte en el sustrato del siguiente.

La mayor parte de los enzimas de cada ruta metabólica siguen los comportamientos cinéticos ya descritos. Sin embargo, en cada ruta hay uno o más enzimas que tienen un mayor efecto sobre la velocidad global de la secuencia de reacciones. Estos **enzimas reguladores** muestran una actividad catalítica mayor o menor en respuesta a ciertas señales. Los ajustes en la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas reguladores y, por tanto, en la velocidad de la secuencia entera de reacciones, permiten que la célula se adapte a las necesidades cambiantes de energía y biomoléculas requeridas para su crecimiento y la reparación de sus componentes.

En la mayoría de sistemas multienzimáticos, el primer enzima de la secuencia es un enzima regulador. Éste es un lugar excelente para regular una ruta metabólica, puesto que la catálisis de tan sólo las primeras reacciones de una ruta que conduce a un producto innecesario despilfarra energía y metabolitos requeridos en procesos más importantes. Otros enzimas de la secuencia pueden tener papeles más sutiles en la regulación del flujo a través de la ruta, tal como se describe en el Capítulo 15.

La actividad de los enzimas reguladores se modula mediante diversos caminos. Los **enzimas alostéricos** funcionan a través de la unión reversible, no covalente, de compuestos reguladores denominados **moduladores alostéricos** o **efectores alostéricos,** los cuales son generalmente metabolitos pequeños o cofactores. Otros enzimas están regulados por **modificación covalente** reversible. Ambas clases de enzimas reguladores tienden a tener varias subunidades y, en algunos casos, el sitio o sitios reguladores y el sitio activo se encuentran en subunidades separadas. En los sistemas metabólicos existen al menos otros dos mecanismos mediante los que se regula la actividad de los enzimas. Algunos enzimas son estimulados o inhibidos por proteínas de control a las que se fijan. Otros se activan cuando se eliminan segmentos peptídicos mediante escisión proteolítica la cual, a diferencia de la regulación mediada por efectores, es irreversible. En procesos fisiológicos tales como la digestión, la coagulación de la sangre, la acción hormonal y la visión se encuentran ejemplos importantes de estos dos tipos de mecanismos.

El crecimiento y la supervivencia celulares dependen del uso eficaz de los recursos, eficiencia que es posible gracias a la acción de los enzimas reguladores. No hay una regla única que gobierne la existencia de diferentes tipos de regulación en sistemas diferentes. Hasta cierto punto, la regulación alostérica (no covalente) puede permitir el control afinado de las rutas metabólicas que funcionan de modo continuado pero a diferentes niveles de actividad cuando cambian las condiciones celulares. La regulación por modificación covalente puede ser del tipo todo o nada (el caso más común en las roturas proteolíticas) o dar lugar a ligeros cambios en la actividad. En un mismo enzima regulador pueden darse varios tipos de regulación. El resto de este capítulo se dedica a discutir acerca de estos procesos de regulación enzimática.

Los enzimas alostéricos experimentan cambios de conformación en respuesta a la unión de moduladores

Tal como hemos visto en el Capítulo 5, las proteínas alostéricas son las que presentan "otras formas" o conformaciones inducidas por la unión de moduladores. El mismo concepto se aplica a ciertos enzimas reguladores, en los que cambios de conformación inducidos por uno o más moduladores interconvierten formas más activas o menos activas del enzima. Los moduladores de enzimas alostéricos pueden ser inhibidores o estimuladores. El mismo sustrato es a menudo el modulador; los enzimas reguladores en los que el sustrato y el modulador son idénticos se denominan homotrópicos. El efecto es similar al de la unión de O_2 a la hemoglobina (Capítulo 5): la unión del ligando, o del sustrato en el caso de los enzimas, origina cambios de conformación que afectan la actividad de otros sitios en la proteína. Cuando el modulador es una molécula diferente del sustrato, se dice que el enzima es heterotrópico. Obsérvese que los moduladores alostéricos no se deben confundir con los inhibidores acompetitivos y mixtos. Aunque estos últimos se unen en un segundo sitio del enzima, no inducen necesariamente cambios de conformación entre las formas activas e inactivas, y los efectos cinéticos son distintos.

Las propiedades de los enzimas alostéricos son significativamente diferentes de las de los enzimas no reguladores sencillos. Algunas de las diferencias son estructurales. Además de sitios activos, los enzimas alostéricos tienen generalmente uno o más sitios reguladores o alostéricos para la unión del modulador **(Fig. 6–31)**. Del mismo modo que el sitio activo de un enzima es específico para su sustrato, cada sitio regulador es específico para su modulador. Los enzimas con varios moduladores tienen generalmente diferentes sitios de fijación específicos para cada uno de ellos. En los enzimas homotrópicos el sitio activo y el sitio regulador son el mismo.

Generalmente los enzimas alostéricos también son mayores y más complejos que los enzimas no alostéricos. La mayoría tienen dos o más subunidades. La aspartato transcarbamilasa, que cataliza una de las primeras reacciones de la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos (véase la Fig. 22–36), tiene 12 cadenas polipeptídicas organizadas en subunidades catalíticas y reguladoras. La **Figura 6–32** muestra la estructura cuaternaria de este enzima deducida a partir de análisis de rayos X.

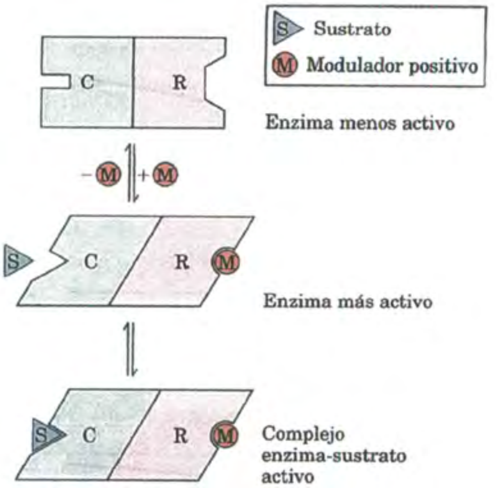


FIGURA 6–31 Interacciones entre subunidades en un enzima alostérico e interacciones con inhibidores y activadores. En muchos enzimas alostéricos el sitio de fijación del sustrato y el sitio, o sitios, de fijación del modulador se encuentran en subunidades diferentes, las subunidades catalíticas (C) y las reguladoras (R), respectivamente. La fijación del modulador (M) positivo (estimulador) a su sitio específico en la subunidad reguladora se comunica a la subunidad catalítica mediante un cambio de conformación. Este cambio hace que la subunidad catalítica sea activa y capaz de fijar el sustrato (S) con mayor afinidad. Al separarse el modulador de la subunidad reguladora, el enzima revierte a su forma inactiva, o menos activa.

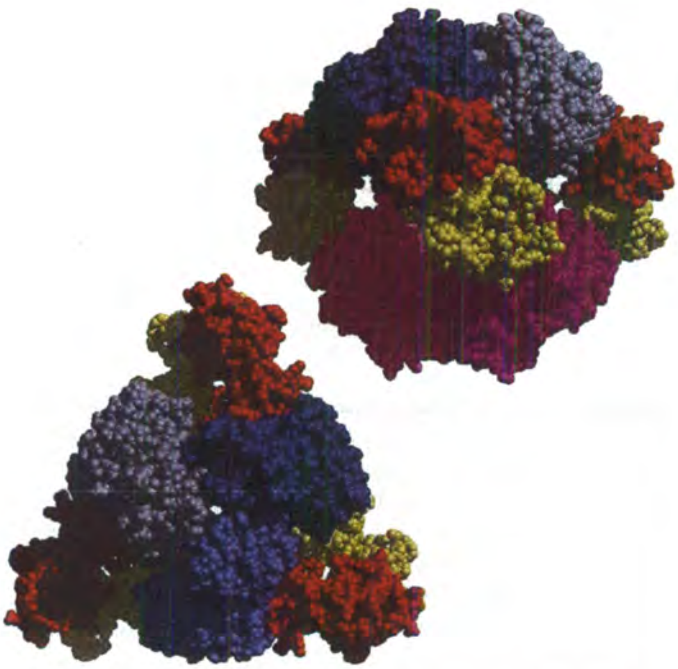


FIGURA 6–32 Dos vistas del enzima regulador aspartato transcarbamilasa. (De PDB ID 2AT2.) Este enzima regulador alostérico tiene dos agrupaciones catalíticas apiladas, cada una de las cuales contiene tres cadenas polipeptídicas catalíticas (en tonos de azul y púrpura) y tres agrupaciones reguladoras cada una con dos cadenas polipeptídicas reguladoras (en rojo y amarillo). Los agrupamientos reguladores forman las puntas de un triángulo que rodea las subunidades catalíticas. Los sitios de fijación de los moduladores alostéricos se encuentran en las subunidades reguladoras. La fijación del modulador produce grandes cambios en la conformación y actividad del enzima. En el Capítulo 22 se discuten el papel de este enzima en la síntesis de nucleótidos y los detalles de su regulación.

Las etapas reguladoras están catalizadas por enzimas alostéricos en muchas rutas

En algunos sistemas multienzimáticos los enzimas reguladores son inhibidos de forma específica por el producto final de la ruta siempre que el producto final se acumule en exceso a las necesidades de la célula. Cuando la reacción del enzima regulador se hace más lenta, todos los enzimas posteriores operan a velocidad reducida ya que sus sustratos se encuentran en menor concentración. De este modo se equilibra la velocidad de formación del producto final con las necesidades de la célula. Este tipo de regulación se denomina **inhibición por retroalimentación** o **retroinhibición.** La acumulación del producto final de la ruta hace que, en último término, toda la ruta funcione más lentamente.

Uno de los primeros ejemplos descubiertos de retroinhibición alostérica fue el sistema enzimático bacteriano que cataliza la conversión de L-treonina en L-isoleucina **(Fig. 6–33)**. El primer enzima de este sistema, la treonina deshidratasa, es inhibido por la isoleucina, que es el producto de la última reacción de la serie. Éste es un ejemplo de inhibición alostérica heterotrópica. La isoleucina es muy específica como inhibidor. Ningún otro intermediario de esta secuencia de reacciones inhibe la treonina deshidratasa, ni ningún otro enzima de la secuencia es inhibido por la isoleucina. La isoleucina no se fija al sitio activo, sino a otro sitio específico de la molécula enzimática denominado sitio regulador. Esta fijación es de tipo no covalente por lo que es fácilmente reversible; si disminuye la concentración de isoleucina, aumenta la velocidad de la deshidratación de la treonina. De este modo la actividad de la treonina deshidratasa responde rá-

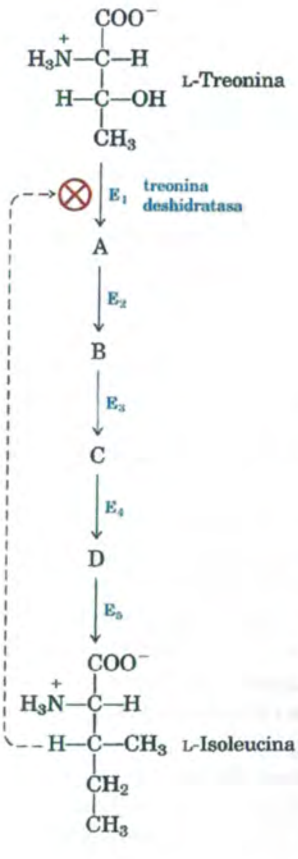


FIGURA 6–33 Inhibición por retroalimentación. La conversión de la L-treonina en L-isoleucina está catalizada por una secuencia de cinco enzimas (E_1 a E_5). La treonina deshidratasa (E_1) es inhibida alostéricamente de manera específica por la L-isoleucina, producto final de la secuencia, pero no por ninguno de los cuatro intermedios (A a D). La retroinhibición se indica por la línea de trazos y por el símbolo ⊗ en la flecha de la reacción de la treonina deshidratasa, un recurso que se utiliza a lo largo de este libro.

pida y reversiblemente a las fluctuaciones en la concentración celular de isoleucina. Como veremos en la Parte II de este libro, los patrones de regulación de muchas rutas metabólicas son mucho más complejos.

Las propiedades cinéticas de los enzimas alostéricos divergen del comportamiento de Michaelis-Menten

Los enzimas alostéricos muestran una relación entre V_0 y [S] que difiere de la cinética de Michaelis–Menten. Aunque se saturan con el sustrato cuando [S] es suficientemente elevada, la mayoría de enzimas alostéricos dan lugar a una curva de saturación sigmoidea cuando se representa V_0 frente a [S] **(Fig. 6–34)**, en lugar de la curva hiperbólica típica de los enzimas no reguladores. En la curva de saturación sigmoidea podemos encontrar un valor de [S] a la que V_0 es mitad de la máxima, pero no nos podemos referir al mismo con la designación K_m ya que el enzima no sigue la relación hiperbólica de Michaelis-Menten. En su lugar se utilizan a menudo los símbolos $[S]_{0,5}$ o $K_{0,5}$ para representar la concentración de sustrato que da la mitad de la velocidad máxima de la reacción catalizada por un enzima alostérico (Fig. 6–34).

El comportamiento cinético sigmoideo es generalmente el reflejo de interacciones cooperativas entre subunidades proteicas. Dicho de otro modo, los cambios en la estructura de una subunidad se traducen en cambios estructurales de las subunidades adyacentes, efecto que es facilitado por interacciones no covalentes en la interfase entre subunidades. Los principios están especialmente bien ilustrados por un no enzima: la fijación de O_2 a la hemoglobina. El comportamiento cinético sigmoideo se explica mediante los modelos concertado y secuencial de interacción de subunidades (véase la Fig. 5–15).

Los enzimas alostéricos homotrópicos suelen ser proteínas con múltiples subunidades y, como se ha visto antes, el mismo sitio de fijación de cada subunidad funciona a la vez como sitio activo y como sitio regulador. Normalmente, el sustrato funciona como modulador positivo (activador) porque las subunidades actúan en forma cooperativa: la fijación de una molécula de sustrato a un sitio de fijación altera la conformación del enzima facilitando la fijación de otras moléculas de sustrato. Esto explica el incremento sigmoideo en lugar de hiperbólico de V_0 al aumentar [S]. Una característica de la cinética sigmoidal es que pequeños cambios en la concentración de un modulador se pueden asociar con grandes cambios en la actividad. Como es evidente en la Figura 6–34a, un incremento relativamente pequeño en [S] en la parte de mayor pendiente de la curva provoca un incremento comparativamente grande en V_0.

En el caso de los enzimas alostéricos heterotrópicos, en los que el modulador es un metabolito diferente del sustrato normal, es difícil generalizar acerca de la forma de la curva de saturación con el sustrato. Un activador puede hacer que la curva de saturación con el sustrato sea más próxima a la hiperbólica, con un descenso de $K_{0,5}$ pero sin cambios en V_{max}, lo que se traduce en un incremento de velocidad de reacción a una concentración de sustrato fija (V_0 es superior para cualquier valor de [S]; Fig. 6–34b, curva superior). Otros enzimas alostéricos heterotrópicos responden a la presencia de un activador con un incremento de V_{max} pero con poco cambio en

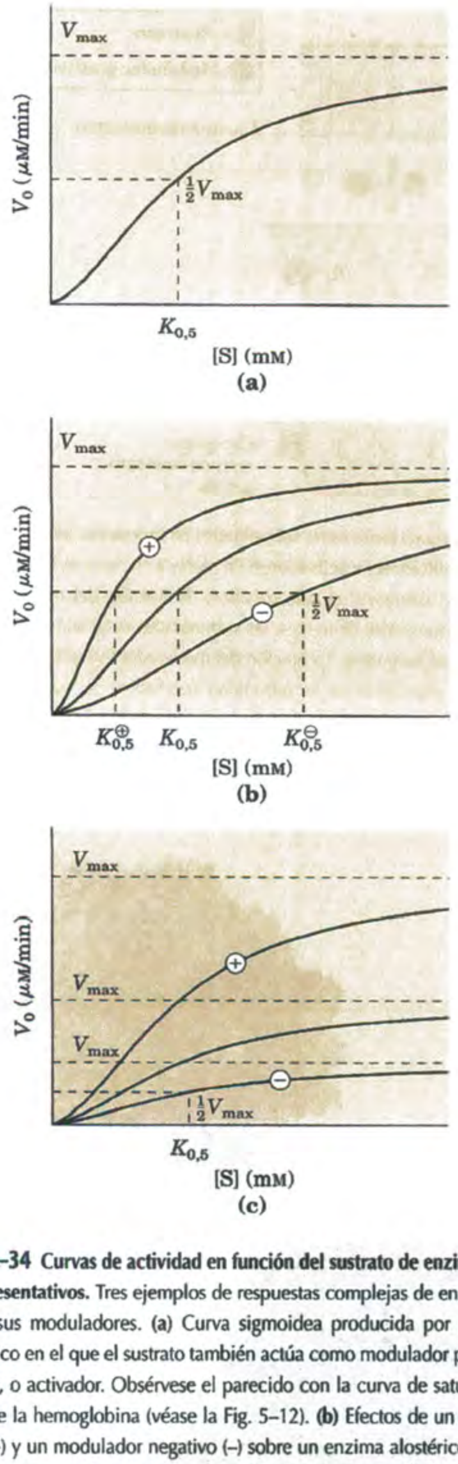


FIGURA 6–34 Curvas de actividad en función del sustrato de enzimas alostéricos representativos. Tres ejemplos de respuestas complejas de enzimas alostéricos a sus moduladores. **(a)** Curva sigmoidea producida por un enzima homotrópico en el que el sustrato también actúa como modulador positivo (estimulador), o activador. Obsérvese el parecido con la curva de saturación por oxígeno de la hemoglobina (véase la Fig. 5–12). **(b)** Efectos de un modulador positivo (+) y un modulador negativo (–) sobre un enzima alostérico en el que $K_{0,5}$ se altera sin cambio en V_{max}. La curva central muestra la relación sustrato–actividad sin modulador. **(c)** Un caso de modulación menos común en el que se altera V_{max} mientras $K_{0,5}$ se mantiene casi constante.

$K_{0,5}$ (Fig. 6–34c). Un modulador negativo (inhibidor) puede producir una curva de saturación de sustrato *más* sigmoidea, con un incremento de $K_{0,5}$ (Fig. 6–34b, curva inferior). Los enzimas alostéricos heterotrópicos muestran, por tanto, diferentes clases de respuesta en sus curvas de actividad frente a sustrato debido a que algunos tienen moduladores inhibidores, otros tienen moduladores activadores y otros los tienen de ambas clases.

Algunos enzimas están regulados por modificación covalente reversible

En otra clase importante de enzimas reguladores la actividad se modula por modificación covalente de uno o más de los residuos aminoácidos de la molécula de enzima. Se han encontrado más de 500 tipos diferentes de modificación covalente de proteínas. Los grupos fosforilo, acetilo, adenililo, uridililo, metilo, amida, carboxilo, miristilo, palmitilo, prenilo, hidroxilo, sulfato y adenosina difosfato ribosilo se cuentan entre los grupos modificadores más comunes **(Fig. 6–35)**. Existen incluso proteínas enteras, como ubiquitina y sumo, que se usan como grupos modificadores especializados. Generalmente estos grupos se unen y son eliminados del enzima regulador por la acción de otros enzimas. La modificación de un residuo aminoácido de un enzima es equivalente a la introducción de un nuevo aminoácido con propiedades alteradas dentro del enzima. La introducción de una carga puede alterar las propiedades locales del enzima e inducir un cambio de conformación. La introducción de un grupo hidrofóbico puede inducir la asociación con una membrana. Los cambios son a menudo importantes y pueden ser críticos para la función del enzima alterado.

La variedad de modificaciones enzimáticas es demasiado grande para ser cubierta con detalle, pero podemos comentar algunos ejemplos. Un ejemplo de enzima regulado por metilación es el de la proteína aceptora de metilos de la quimiotaxis de las bacterias. Esta proteína forma parte de un sistema que le permite a una bacteria nadar hacia una sustancia atrayente en disolución (por ejemplo un azúcar) y alejarse de las sustancias químicas repelentes. El agente metilante es la *S*-adenosilmetionina (adoMet) (véase la Fig. 18–18). La acetilación es una modificación común que afecta aproximadamente al 80% de las proteínas solubles en eucariotas, entre las que se encuentran muchos enzimas, y que supone la acetilación de sus extremos amino terminales. La ubiquitina se une a las proteínas como una marca que las predestina para su degradación proteolítica (véase la Fig. 27–47). La ubiquitinación puede tener también una función reguladora. Sumo se encuentra unida a muchas proteínas nucleares eucarióticas que intervienen en la regulación de la transcripción, en la estructura de la cromatina y en la reparación del DNA.

La ADP-ribosilación es una reacción especialmente interesante, observada en algunas proteínas; la ADP-ribosa proviene del nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (véase la Fig. 8–38). Este tipo de modificación se da en la dinitrogenasa reductasa bacteriana, que regula el importante proceso de la fijación biológica del nitrógeno. Las toxinas de la difteria y del cólera son enzimas que catalizan la ADP-ribosilación (e inactivación) de enzimas o proteínas celulares claves.

La fosforilación es probablemente la modificación reguladora más importante. Se calcula que un tercio de todas las proteínas de la célula eucariotica están fosforiladas, y que prácticamente en todos los procesos reguladores participan uno o (a menudo) muchos pasos de fosforilación. Algunas proteínas tiene sólo un residuo fosforilado, otras presentan varios y algunas tienen docenas de sitios fosforilables. Este tipo de modificación covalente juega un papel central en un gran número de rutas reguladoras, por lo que se discute aquí con cierto detalle. Se discutirá más ampliamente en el Capítulo 12.

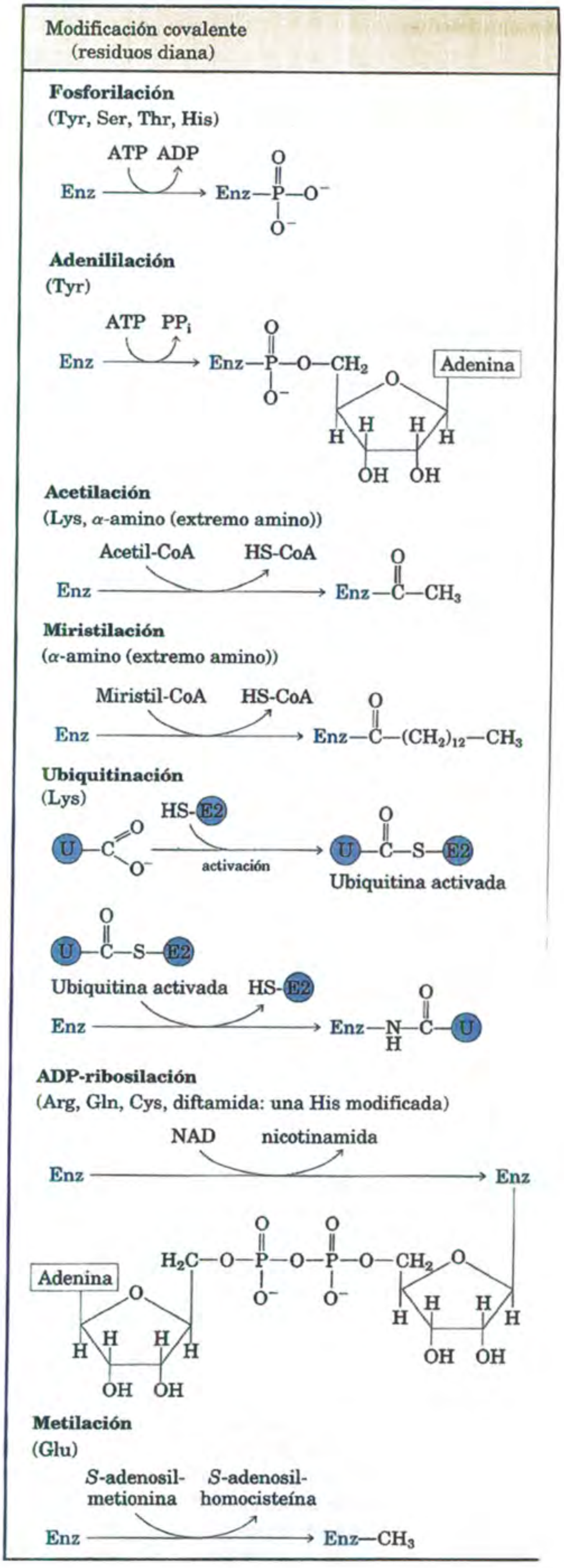


FIGURA 6–35 Algunos ejemplos de reacciones de modificación de enzimas.

A lo largo del texto se irán encontrando todas las modificaciones aquí descritas.

Los grupos fosforilo afectan la estructura y la actividad catalítica de los enzimas

Las **proteína quinasas** catalizan la unión de grupos fosforilo a residuos aminoácidos específicos de una proteína; la eliminación de los grupos fosforilo está catalizada por las **proteína fosfatasas.** La unión de un grupo fosforilo a un residuo de Ser, Thr o Tyr introduce un grupo cargado y voluminoso en una región que era sólo moderadamente polar. Los átomos de oxígeno de un grupo fosforilo pueden formar enlaces de hidrógeno con uno o varios grupos de la proteína, generalmente los grupos amida de la cadena peptídica al inicio de una hélice α o los grupos guanidinio cargados de la cadena lateral de una Arg. Las dos cargas negativas de la cadena lateral fosforilada también pueden repeler los residuos cargados negativamente (Asp o Glu). Cuando la cadena lateral modificada se sitúa en una región del enzima critica para su estructura tridimensional, se puede esperar que la fosforilación tenga efectos muy importantes en la conformación de la proteína y, por tanto, en la fijación del sustrato y la catálisis.

Un ejemplo importante de regulación enzimática por fosforilación se encuentra en la glucógeno fosforilasa (M_r 94.500) de músculo e hígado (Capítulo 15), que cataliza la reacción

$$\underset{\text{Glucógeno}}{(\text{Glucosa})_n} + \text{P}_i \longrightarrow \underset{\substack{\text{Cadena de}\\ \text{glucógeno}\\ \text{acortada}}}{(\text{glucosa})_{n-1}} + \text{glucosa 1-fosfato}$$

La glucosa 1-fosfato así formada puede utilizarse para la síntesis de ATP en el músculo o ser convertida en glucosa libre en el hígado. La glucógeno fosforilasa se presenta en dos formas: la forma más activa fosforilasa a y la forma menos activa fosforilasa b **(Fig. 6–36)**. La fosforilasa a consta de dos subunidades, cada una de las cuales contiene un residuo Ser específico que está fosforilado en su grupo hidroxilo. Estos residuos serina fosfato son necesarios para alcanzar la actividad máxima del enzima. Los grupos fosforilo se pueden eliminar hidrolíticamente por un enzima diferente denominado fosforilasa fosfatasa:

$$\underset{\text{(más activa)}}{\text{Fosforilasa } a} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \underset{\text{(menos activa)}}{\text{fosforilasa } b} + 2\text{P}_i$$

En esta reacción la fosforilasa a se convierte en fosforilasa b mediante la rotura de dos enlaces serina-fosfato covalentes, uno en cada subunidad de la glucógeno fosforilasa.

La fosforilasa b puede, a su vez, reactivarse –volver a convertirse covalentemente en fosforilasa a activa– por mediación de otro enzima, la fosforilasa quinasa, que cataliza la transferencia de grupos fosforilo desde el ATP a los grupos hidroxilo de los dos residuos específicos de Ser en la fosforilasa b:

$$2\text{ATP} + \underset{\text{(menos activa)}}{\text{fosforilasa } b} \longrightarrow 2\text{ADP} + \underset{\text{(más activa)}}{\text{fosforilasa } a}$$

La degradación del glucógeno en el músculo esquelético y en el hígado está regulada por variaciones en las proporciones de las dos formas de la glucógeno fosforilasa. Las formas a y b difieren en sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria; cuando se interconvierten las dos formas, el sitio activo experimenta cambios de estructura y, en consecuencia, cambios en la actividad catalítica.

La regulación de la glucógeno fosforilasa mediante fosforilación muestra las consecuencias de la adición de un grupo fosforilo tanto en la estructura como en la actividad catalítica. En el estado no fosforilado, cada subunidad de este enzima se pliega de manera que acerca 20 residuos de su extremo amino-terminal, entre los que se incluyen muchos residuos básicos, hacia una región que contiene varios aminoácidos acídicos; esto origina interacciones electroestáticas que estabilizan la conformación. La fosforilación de la Ser^{14} interfiere en esta interacción,

FIGURA 6–36 Regulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa muscular mediante múltiples mecanismos. La actividad de la glucógeno fosforilasa de músculo está sujeta a un sistema de regulación en múltiples niveles en el que intervienen modificación covalente (fosforilación), regulación alostérica y una cascada reguladora sensible al estatus hormonal que actúa sobre los enzimas implicados en la fosforilación y desfosforilación. En la forma más activa del enzima, la fosforilasa *a*, se fosforilan residuos Ser específicos, uno en cada subunidad. La fosforilasa a se convierte en la fosforilasa *b* menos activa por eliminación enzimática, promovida por la fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1), de esos grupos fosforilo. La fosforilasa *b* puede reconvertirse (reactivarse) en fosforilasa a por acción de la fosforilasa quinasa. La actividad de ambas formas del enzima está regulada alostéricamente por un activador (AMP) y por inhibidores (glucosa 6-fosfato y ATP) que se unen a sitios distintos del enzima. Las actividades de la fosforilasa quinasa y de la PP1 también están reguladas a través de una corta ruta de reacciones que responde a las hormonas glucagón y adrenalina. Cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, el páncreas y las glándulas suprarrenales secretan glucagón y adrenalina. La adrenalina se une a su receptor muscular y de otros tejidos y activa el enzima adenilil ciclasa. El glucagón juega un papel similar, uniéndose a receptores hepáticos. Esta unión conduce a la síntesis de niveles elevados del nucleótido cíclico modificado AMP cíclico (cAMP; véase la pág. 298), activando el enzima proteína quinasa dependiente de cAMP (llamado también proteína quinasa A o PKA). La PKA fosforila varias proteínas diana, entre las que se cuenta la fosforilasa quinasa y el inhibidor 1 de la fosfoproteína fosfatasa (PPI-1). La fosforilasa quinasa fosforilada se activa y a su vez fosforila la glucógeno fosforilasa activándola. Al mismo tiempo, el PPI-1 fosforilado interacciona con la PP1 y la inactiva. El PPI-1, por su parte, puede mantenerse también activo (fosforilado) mediante inhibición de la fosfoproteína fosfatasa 2B (PP2B), el enzima que lo desfosforila (inactivándolo). De este modo, el equilibrio entre las formas *a* y *b* de la glucógeno fosforilasa se decanta definitivamente hacia la forma más activa de glucógeno fosforilasa *a*. Observe que ambas formas de fosforilasa quinasa se activan hasta cierto punto por acción del ión Ca^{2+} (no mostrado en la Figura). Esta ruta se discute con mayor detalle en los Capítulos 14, 15 y 23.

forzando el dominio amino-terminal a moverse hacia fuera del entorno acídico y a adoptar una conformación que permite la interacción entre Ⓟ-Ser y varias cadenas laterales de Arg. En esta conformación el enzima es mucho más activo.

La fosforilación de un enzima puede afectar a la catálisis por otra vía: mediante la modificación de la afinidad de fijación del sustrato. Por ejemplo, cuando se fosforila la isocitrato deshidrogenasa (un enzima del ciclo del ácido cítrico; Capítulo 16), la repulsión electrostática del grupo fosforilo inhibe la fijación de citrato (un ácido tricarboxílico) en el sitio activo.

Las fosforilaciones múltiples permiten un control exquisito de la regulación

Los residuos Ser, Thr o Tyr fosforilados en las proteínas reguladoras se presentan dentro de motivos estructurales comunes, en las denominadas secuencias consenso, que son reconocidas por proteína quinasas específicas (Tabla 6–10). Algunas quinasas son basofílicas, prefiriendo fosforilar un residuo que tenga vecinos básicos; otras presentan diferentes preferencias de sustrato, tal como un residuo cercano a una Pro. Sin embargo, la secuencia primaria no es el único factor importante en la determinación de si un residuo será fosforilado o no. El plegamiento proteico acerca residuos distantes en la secuencia primaria; la estructura tridimensional resultante puede determinar si una proteína quinasa tiene acceso a un residuo determinado y puede reconocerlo como sustrato. Otro factor que influye en la especificidad de sustrato de ciertas proteína quinasas es la proximidad de otros residuos fosforilados.

La regulación por fosforilación es a menudo complicada. Algunas proteínas tienen secuencias consenso reconocidas por varias proteína quinasas diferentes, cada una de las cuales puede fosforilar la proteína y variar su actividad enzimática. En algunos casos la fosforilación es jerárquica: un determinado residuo se puede fosforilar sólo si un residuo vecino se ha fosforilado primero. Por ejemplo, la glucógeno sintasa, el enzima que cataliza la condensación de monómeros de glucosa para formar glucógeno (Capítulo 15) está inactivada por fosforilación de residuos Ser específicos y su actividad está también modulada por al menos otras cuatro proteínas quinasas que fosforilan otros tantos sitios del enzima **(Fig. 6–37)**. El enzima no es, por ejemplo, un sustrato de la glucógeno sintasa quinasa 3 hasta que un sitio ha sido fosforilado por la caseína quinasa II. Algunas fosforilaciones inhiben más que otras la glucógeno sintasa, y algunas

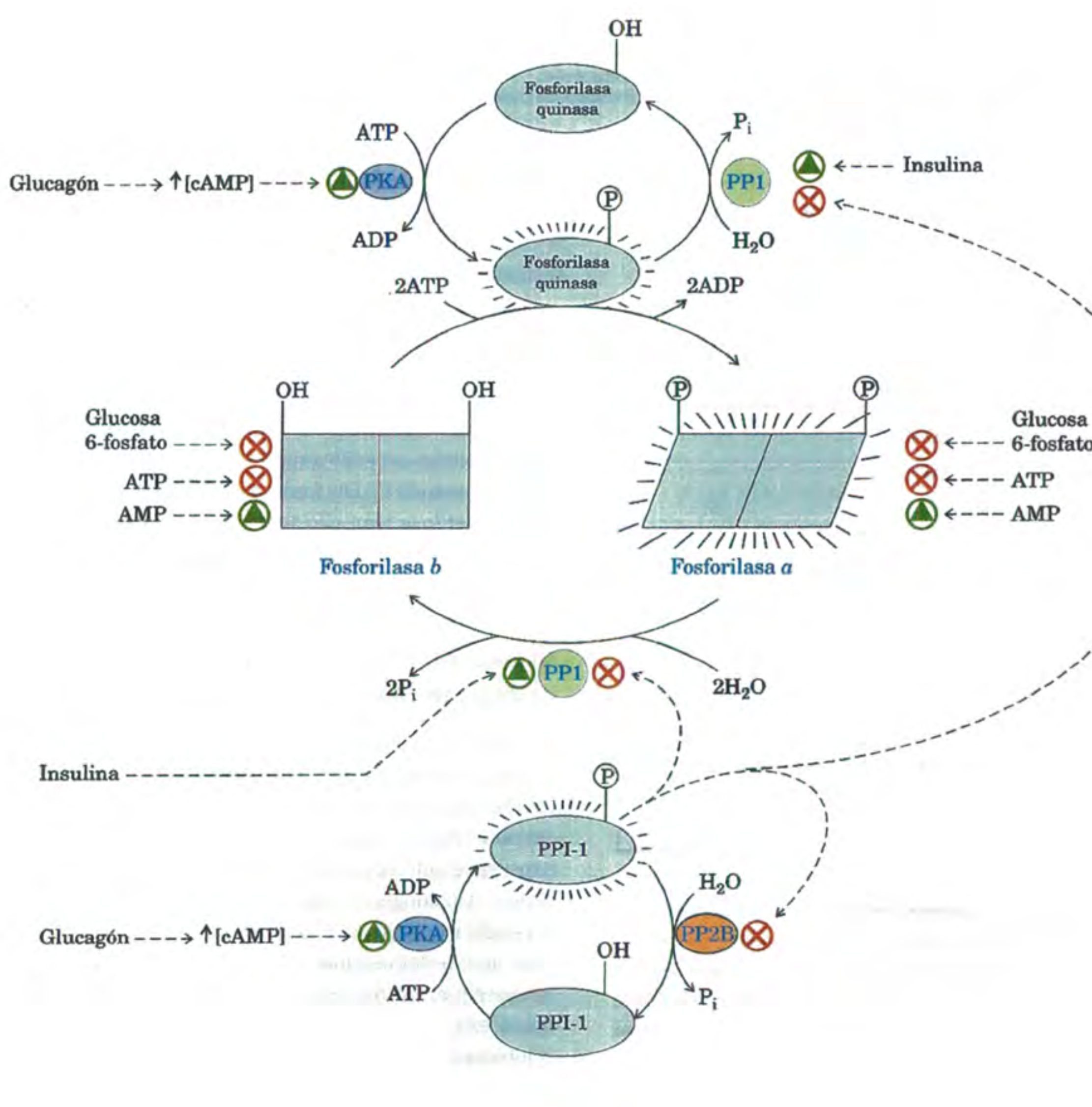


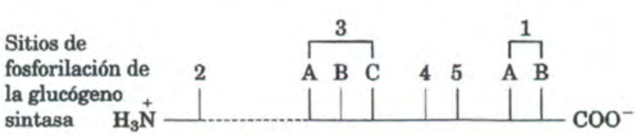
TABLA 6–10 Secuencias consenso para las proteínas quinasas

Proteína quinasa	Secuencias consenso y residuos fosforilados*
Proteína quinasa A	-x-R-[RK]-x-[ST]-B-
Proteína quinasa G	-x-R-[RK]-x-[ST]-x-
Proteína quinasa C	-[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)-
Proteína quinasa B	-x-R-x-[ST]-x-K-
Ca^{2+}/calmodulina quinasa I	-B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B-
Ca^{2+}/calmodulina quinasa II	-B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)-
Cadena ligera de la miosina quinasa (músculo liso)	-K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)-
Fosforilasa *b* quinasa	*-K-R-K-Q-I-S-V-R-*
Quinasa extracelular regulada por señal (ERK)	-P-x-[ST]-P(2)-
Proteína quinasa dependiente de ciclina (cdc2)	-x-[ST]-P-x-[KR]-
Caseína quinasa I	-[SpTp]-x(2)-[ST]-B†
Caseína quinasa II	-x-[ST]-x(2)-[ED]-x-
Receptor *β*-adrenérgico quinasa	-[DE](*n*)-[ST]-x(3)
Rodopsina quinasa	-x(2)-[ST]-E(*n*)-
Receptor de insulina quinasa	-x-E(3)-Y-M(4)-*K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K(3)-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-*
Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) quinasa	*-E(4)-Y-F-E-L-V-*

Fuentes: Pinna, L.A. & Ruzzene, M.H. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191–225; Kemp, B.E. & Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 342–346; Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15.555–15.558.

*Se muestran aquí las secuencias consenso deducidas (en tipo redonda) y las secuencias reales de sustratos conocidos (en itálica). Los residuos Ser (S), Thr (T) o Tyr (Y) que se fosforilan están en rojo; todos los residuos aminoácidos se presentan en abreviaturas de una letra (véase la Tabla 3–1). x representa cualquier aminoácido; B, cualquier aminoácido hidrofóbico; Sp, Tp y Yp residuos de Ser, Thr y Tyr que deben estar ya fosforilados para que la quinasa reconozca el sitio.

†El mejor sitio diana tiene dos residuos aminoácidos que separan los residuos diana Ser/Thr fosforilados; los sitios diana con uno o con tres residuos intercalados funcionan a nivel reducido.



Quinasa	Sitios de fosforilación	Grado de inactivación de la sintasa
Proteína quinasa A	1A, 1B, 2, 4	+
Proteína quinasa G	1A, 1B, 2	+
Proteína quinasa C	1A	+
Ca^{2+}/calmodulina quinasa	1B, 2	+
Fosforilasa quinasa *b*	2	+
Caseína quinasa I	al menos nueve	+ + + +
Caseína quinasa II	5	0
Gucógeno sintasa quinasa 3	3A, 3B, 3C	+ + +
Gucógeno sintasa quinasa 4	2	+

FIGURA 6–37 Fosforilaciones reguladoras múltiples. El enzima glucógeno sintasa contiene al menos nueve sitios separados en cinco regiones y que son susceptibles de fosforilación por una de las proteína quinasas celulares. De este modo, la regulación de este enzima no es cuestión de una conmutación (on/off) binaria, sino que resulta de una modulación finamente ajustada de la actividad con un margen de respuesta amplio a una diversidad de señales.

combinaciones de fosforilaciones son acumulativas. Estas fosforilaciones reguladoras múltiples proporcionan el potencial para una regulación extremadamente sutil de la actividad enzimática.

Para ser útil como mecanismo regulador efectivo, la fosforilación ha de ser reversible. En general, los grupos fosforilo se añaden y eliminan mediante enzimas diferentes y, por consiguiente, los procesos se pueden regular independientemente. Las células contienen una familia de fosfoproteína fosfatasas que hidrolizan específicamente los ésteres Ⓟ-Ser, Ⓟ-Thr y Ⓟ-Tyr, liberando P_i. Las fosfoproteína fosfatasas conocidas hasta el momento actúan sólo sobre un conjunto de fosfoproteínas, pero presentan una especificidad de sustrato menor que las proteína quinasas.

Algunos enzimas y otras proteínas son regulados mediante la rotura proteolítica de un precursor enzimático

En algunos enzimas, la escisión de un precursor inactivo denominado **zimógeno** es necesaria para formar el enzima activo. Muchos enzimas proteolíticos (proteasas) del estómago y del páncreas se regulan de esta manera. La quimotripsina y la tripsina se sintetizan inicialmente en forma de quimotripsinógeno y tripsinógeno, respectivamente **(Fig. 6–38)**. La rotura específica produce cambios de conformación que exponen el sitio activo del enzima. Dado que este tipo de activación es irreversible, se necesitan otros mecanismos para inactivar estos enzimas. Las poteasas son inactivadas por proteínas inhibidoras que se fijan muy fuertemente al sitio activo del

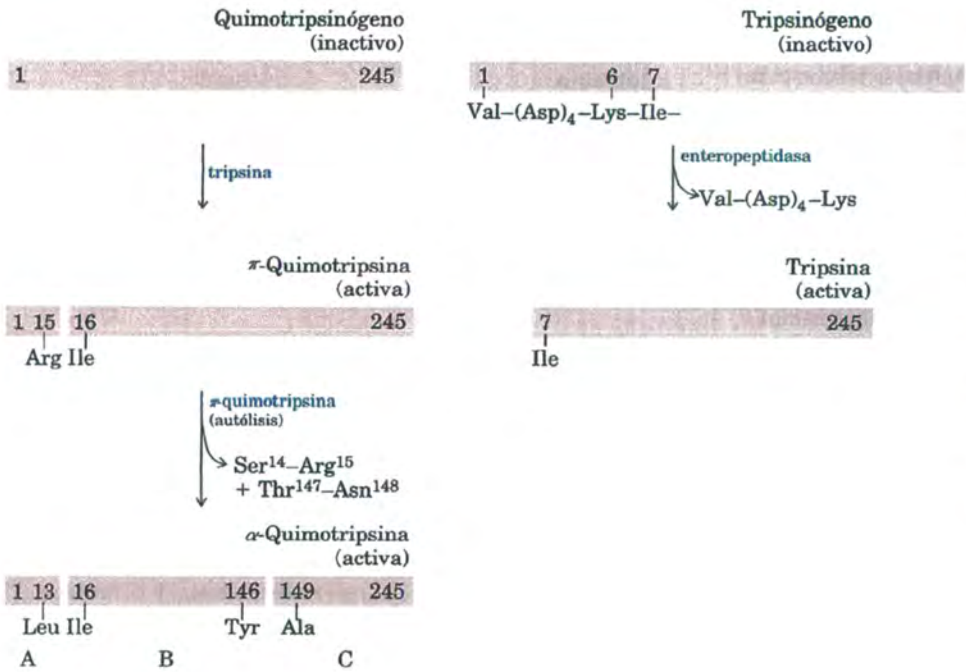


FIGURA 6–38 Activación de zimógenos por rotura proteolítica. Aquí se muestra la formación de quimotripsina y tripsina a partir de sus zimógenos, quimotripsinógeno y tripsinógeno. Las barras representan la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas, y los números representan las posiciones relativas de los residuos (el residuo amino-terminal es el número 1). Los residuos en los extremos de los fragmentos polipeptídicos generados por la rotura se indican debajo de las barras. Observe que algunos números están ausentes en las formas activas finales. Recuerde que las tres cadenas polipeptídicas (A, B y C) de la quimotripsina están unidas por puentes disulfuro (véase la Fig. 6–18).

enzima. Por ejemplo, el inhibidor pancreático de tripsina (M_r 6.000) se fija a la tripsina inhibiéndola; la α_1-antiproteinasa (M_r 53.000) inhibe principalmente la elastasa de neutrófilos (los neutrófilos son un tipo de leucocitos o glóbulos blancos de la sangre; la elastasa es una proteasa que actúa sobre la elastina, un componente de algunos tejidos conjuntivos). La insuficiencia de α_1-antiproteinasa, que puede ser debida a la exposición al humo del tabaco, se ha asociado con lesiones pulmonares, entre ellas el enfisema.

Las proteasas no son las únicas proteínas activadas por proteólisis. Sin embargo, en otros casos, los precursores no reciben el nombre de zimógenos sino, más generalmente, **proproteínas** o **proenzimas.** Por ejemplo, el colágeno del tejido conjuntivo se sintetiza inicialmente en forma de un precursor soluble denominado procolágeno. La coagulación de la sangre está mediada por una complicada cascada de activaciones proteolíticas: la fibrina, la proteína de los coágulos sanguíneos, se origina por proteólisis de su proproteína inactiva, el fibrinógeno; la proteasa responsable de esta activación es la trombina (similar en muchos aspectos a la quimotripsina), la cual a su vez se origina por proteólisis de una proproteína (en este caso un zimógeno), la protrombina.

Algunos enzimas reguladores utilizan varios mecanismos de regulación

La glucógeno fosforilasa cataliza la primera reacción de una ruta que alimenta con glucosa almacenada las rutas del metabolismo de glúcidos que proporcionan energía (Capítulos 14 y 15). Ésta es una etapa metabólica importante y su regulación es, en consecuencia, compleja. Aunque la regulación primaria de la glucógeno fosforilasas se da a través de una modificación covalente, tal como se describió en la Figura 6–36, la glucógeno fosforilasa está también modulada alostéricamente por AMP, que es un activador de la fosforilasa *b*, y por la glucosa 6-fosfato y ATP, ambos inhibidores del enzima. Además, los enzimas que añaden y eliminan grupos fosforilo son a su vez regulados por los niveles de las hormonas que regulan el azúcar en sangre, por lo que el sistema entero resulta sensible a estas hormonas (Fig. 6–36; véanse también los Capítulos 15 y 23).

Se han encontrado otros enzimas reguladores complejos en encrucijadas metabólicas clave. Uno de los enzimas reguladores más complejos conocidos es la glutamina sintetasa bacteriana, que cataliza una reacción que introduce nitrógeno reducido en el metabolismo celular (Capítulo 22). Está regulada alostéricamente (con ocho moduladores alostéricos diferentes, como mínimo); por modificación covalente reversible y mediante la asociación con otras proteínas reguladoras, un mecanismo que se examinará en detalle cuando consideremos la regulación de rutas metabólicas específicas.

¿Cuál es la ventaja de semejante complejidad en la regulación de la actividad enzimática? Hemos empezado este capítulo remarcando la importancia central de la catálisis en la existencia de la vida. El *control* de la catálisis también es crítico para la vida. Si todas las reacciones posibles en una célula se catalizaran simultáneamente, las macromoléculas y los metabolitos se escindirían rápidamente en formas químicas mucho más simples. Por el contrario, en las células sólo se catalizan las reacciones necesarias en un momento dado. Cuando los recursos químicos son abundantes, se sintetizan y almacenan glucosa y otros metabolitos. Cuando son escasos, las células utilizan estos depósitos para hacer funcionar el metabolismo celular. La energía química se utiliza económicamente, repartiéndose entre las diversas rutas metabólicas según dicten las necesidades celulares. La disponibilidad de catalizadores poderosos, cada uno específico para una reacción determinada, hace posible la regulación de estas reacciones. Éstas a su vez originan la compleja y altamente regulada sinfonía que denominamos vida.

RESUMEN 6.5 Enzimas reguladores

- La actividad de las rutas metabólicas en las células está regulada mediante el control de las actividades de ciertos enzimas.
- En la retroinhibición, el producto final de una ruta inhibe al primer enzima de la misma.
- La actividad de los enzimas alostéricos se ajusta mediante unión reversible de un modulador específico a un sitio regulador. Los moduladores pueden ser el propio sustrato o algún otro metabolito, y el efecto del modulador puede ser activador o inhibidor. El comportamiento cinético de los enzimas alostéricos es un reflejo de las interacciones cooperativas entre subunidades del enzima.
- Otros enzimas reguladores son modulados mediante modificación covalente de un grupo funcional específico necesario para la actividad. La fosforilación de residuos aminoácidos específicos es un método muy común de regulación de la actividad enzimática.
- Muchos enzimas proteolíticos se sintetizan como precursores inactivos denominados zimógenos, que se activan por rotura de fragmentos peptídicos pequeños.
- Los enzimas que actúan en importantes intersecciones metabólicas pueden estar regulados a través de complejas combinaciones de efectores, lo que permite la coordinación de las actividades en rutas interconectadas.

Palabras clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

Bibliografía

General

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**.
Una colección de artículos excelentes sobre temas básicos; continúa siendo muy útil.

Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W. H. Freeman and Company, New York.
Introducción concisa escrita con mucha claridad. Grado avanzado.

Frey, P.A. & Hegeman, A.D. (2006) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.
Una fuente autorizada y puesta al día sobre las reacciones que tienen lugar en los seres vivos

Friedmann, H. (ed.) (1981) *Benchmark Papers in Biochemistry*, Vol. 1: *Enzymes*, Hutchinson Ross Publ. Company, Stroudsburg, PA.
Colección de artículos clásicos sobre la química de los enzimas con comentarios históricos a cargo del editor. Sumamente interesante.

Jencks, W.P. (1987) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover Publications, Inc., New York.
Un libro excepcional sobre el tema. De nivel más avanzado.

Kornberg, A. (1989) *For the Love of Enzymes: The Odyssey of a Biochemist*, Harvard University Press, Cambridge.

Principios de catálisis

Amyes, T.L., O'Donoghue, A.C., & Richard, J.P. (2001) Contribution of phosphate intrinsic binding energy to the enzymatic rate acceleration for triosephosphate isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11,325–11,326.

Gutteridge, A. & Thornton, J.M. (2005) Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 622–629.
Una interesante discusión sobre el origen de la energía de fijación.

Hammes-Schiffer, S. & Benkovic, S.J. (2006) Relating protein motion to catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 519–541.
Una buena descripción de la importancia del movimiento proteico en la catálisis.

Hansen, D.E. & Raines, R.T. (1990) Binding energy and enzymatic catalysis. *J. Chem. Educ.* **67**, 483–489.
Buen libro para que el estudiante principiante adquiera un mejor conocimiento de los principios de la catálisis.

Harris, T.K. & Turner, G.J. (2002) Structural basis of perturbed pK_a values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life* **53**, 85–98.

Kraut, D.A., Carroll, K.S., & Herschlag, D. (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 517–571.
Un buen resumen de los principios de la catálisis enzimática tal y como los vemos hoy en día, y sobre lo que todavía no comprendemos.

Kraut, J. (1988) How do enzymes work? *Science* **242**, 533–540.

Lerner, R.A., Benkovic, S.J., & Schulz, P.G. (1991) At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* **252**, 659–667.

Miller, B.G. & Wolfenden, R. (2002) Catalytic proficiency: the un-usual case of OMP decarboxylase. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 847–885.

La orotidina monofosfato decarboxilasa parece ser el campeón en la categoría de aumento de la velocidad a cargo de un enzima.

Schramm, V.L. (1998) Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 693–720.

Muchas ilustraciones buenas de los principios presentados en este capítulo.

Cinética

Cleland, W.W. (1977) Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* **45**, 273–387.

Cleland, W.W. (2002) Enzyme kinetics: steady state. In *Encyclopedia of Life Sciences,* John Wiley & Sons, Inc./Wiley Interscience, www.els.net.

Una presentación clara y concisa de los principios básicos.

Raines, R.T. & Hansen, D.E. (1988) An intuitive approach to steady-state kinetics. *J. Chem. Educ.* **65**, 757–759.

Ejemplos de enzimas

Babbitt, P.C. & Gerlt, J.A. (1997) Understanding enzyme superfamilies: chemistry as the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities. *J. Biol. Chem.* **27**, 30,591–30,594.

Una descripción interesante de la evolución de los enzimas con diferentes especificidades catalíticas, haciendo uso de un repertorio limitado de motivos estructurales de proteínas.

Babbitt, P.C., Hasson, M.S., Wedekind, J.E., Palmer, D.R.J., Barrett, W.C., Reed, G.H., Rayment, I., Ringe, D., Kenyon, G.L., & Gerlt, J.A. (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the α-protons of carboxylic acids. *Biochemistry* **35**, 16,489–16,501.

Kirby, A.J. (2001) The lysozyme mechanism sorted—after 50 years. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 737–739.

Discusión interesante acerca del poder catalítico de los enzimas y los principios en que se sustenta

Warshel, A., Naray-Szabo, G., Sussman, F., & Hwang, J.-K. (1989) How do serine proteases really work? *Biochemistry* **28**, 3629–3637.

Enzimas reguladores

Barford, D., Das, A.K., & Egloff, M.-P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 133–164.

Ehrmann, M. & Clausen, T. (2004) Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 709–724.

Hunter, T. & Plowman, G.D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 18–22.

Detalles sobre la variedad de estos importantes enzimas en un eucariota modelo.

Johnson, L.N. & Barford, D. (1993) The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 199–232.

Koshland, D.E., Jr. & Neet, K.E. (1968) The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **37**, 359–410.

Monod, J., Changeux, J.-P., & Jacob, F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* **6**, 306–329.

Artículo clásico que introduce el concepto de regulación alostérica.

Problemas

1. Mantenimiento del sabor dulce del maíz El sabor dulce del maíz recién cosechado es debido a la gran cantidad de azúcar de los granos. El maíz comprado en la tienda (varios días después de la cosecha) no es tan dulce debido a que el 50% del azúcar libre del maíz se convierte en almidón durante el primer día después de la cosecha. Para mantener el sabor dulce del maíz fresco, se procede a sumergir las espigas en agua hirviente durante unos minutos (se escaldan) enfriándose posteriormente en agua fría. El maíz procesado de esta manera y mantenido en un congelador mantiene su dulzor inicial. ¿Cuál es la base bioquímica de este proceso?

2. Concentración intracelular de enzimas Para calcular aproximadamente la concentración real de enzimas en una célula bacteriana, suponga que la célula contiene 1.000 enzimas diferentes a igual concentración disueltos en el citosol, y que cada proteína tiene una masa molecular relativa de 100.000. Suponga que la célula bacteriana es un cilindro (diámetro 1 μm, altura 2 μm). Si el citosol (densidad 1,20) contiene un 20% de proteína soluble en peso y si la proteína soluble consiste únicamente en enzimas, calcule la concentración molar *media* de cada enzima en esta célula hipotética.

3. Incremento de velocidad por la ureasa El enzima ureasa aumenta la velocidad de hidrólisis de la urea a pH 8,0 y 20 °C en un factor de 10^{14}. Si una cantidad dada de ureasa puede hidrolizar completamente una cantidad determinada de urea en 5 min a 20 °C y pH 8,0, ¿cuánto tardará en hidrolizarse esta cantidad de urea en las mismas condiciones pero en ausencia de ureasa? Suponga que ambas reacciones tienen lugar en sistemas estériles de modo que las bacterias no pueden atacar la urea.

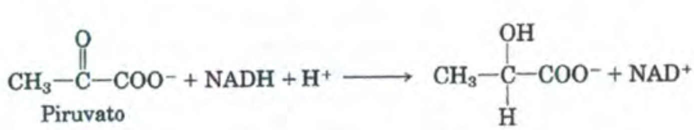
4. Protección de un enzima contra la desnaturalización por calor Cuando se calientan soluciones de enzima, se produce una pérdida progresiva de la actividad con el tiempo debida a la desnaturalización del enzima. Una disolución del enzima hexoquinasa incubada a 45 °C perdió el 50% de su actividad en 12 minutos, pero cuando se incubó la hexoquinasa a 45 °C en presencia de una gran concentración de uno de sus sustratos solamente perdió el 3% de su actividad. Sugiera por qué razón la desnaturalización térmica de la hexoquinasa se retardó en presencia de uno de sus sustratos.

5. Requerimientos del sitio activo de los enzimas La carboxipeptidasa, que elimina secuencialmente los residuos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de sus sustratos peptídicos, está formada por una cadena sencilla de 307 aminoácidos. Los dos grupos catalíticos esenciales del sitio activo son proporcionados por Arg^{145} y Glu^{270}.

(a) Si la cadena de carboxipeptidasa fuese una hélice α perfecta, ¿qué distancia existiría (en nanómetros) entre Arg^{145} y Glu^{270}? (Pista: Vea la Fig. 4–4a.)

(b) Explique por qué estos dos residuos aminoácidos tan lejanos en la secuencia, pueden catalizar una reacción que tiene lugar en un espacio de unas décimas de nanómetro.

6. Determinación cuantitativa de la actividad de la lactato deshidrogenasa El enzima muscular lactato deshidrogenasa cataliza la reacción



Piruvato

Lactato

NADH y NAD⁺ son las formas reducida y oxidada, respectivamente, del coenzima NAD. Las disoluciones de NADH, pero *no* las de NAD⁺, absorben luz a 340 nm. Esta propiedad se utiliza normalmente para determinar la concentración de NADH en di-

solución midiendo espectrofotométricamente la cantidad de luz absorbida por la disolución a 340 nm. Explique cómo se pueden utilizar estas propiedades del NADH para diseñar una determinación cuantitativa de la actividad de la lactato deshidrogenasa.

7. Efecto de los enzimas sobre las reacciones ¿Cuál de los efectos indicados sería provocado por un enzima que catalizara la reacción simple

$$S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P \qquad \text{donde} \qquad K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]}?$$

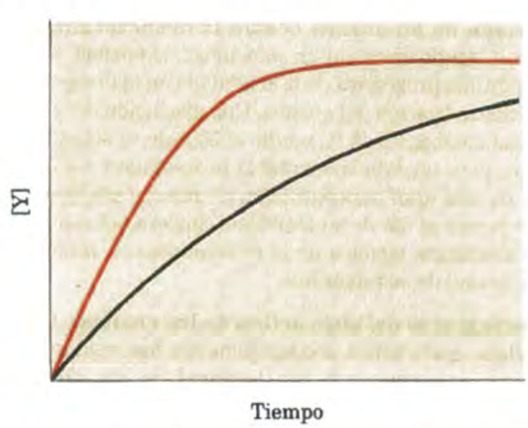
(a) Descenso de K'_{eq}; (b) aumento de k_1; (c) aumento de K'_{eq}; (d) aumento de $\Delta G^{\ddagger}$; (e) descenso de $\Delta G^{\ddagger}$; (f) $\Delta G'^{\circ}$ más negativa ; (g) aumento de k_2.

8. Relación entre velocidad de reacción y concentración de sustrato: Ecuación de Michaelis-Menten

(a) ¿A qué concentración de sustrato mostrará un enzima cuya k_{cat} es $30{,}0 \text{ s}^{-1}$ y su K_m 0,0050 M una cuarta parte de su velocidad máxima?

(b) Determine la fracción de V_{max} que se encontrará a las siguientes [S]: $\frac{1}{2} K_m$, $2 K_m$ y $10 K_m$.

(c) Se aísla un enzima que cataliza la reacción $X \rightleftharpoons Y$ a partir de dos especies bacterianas. Los enzimas tienen la misma V_{max} pero diferentes valores de K_m para el sustrato X. El enzima A tiene una K_m de 2,0 μM, mientras que el enzima B tiene una K_m de 0,5 μM, La gráfica inferior muestra la cinética de las reacciones llevadas a cabo con la misma concentración de cada enzima y con [X] = 1 μM, ¿Qué curva corresponde a cada enzima?



9. Aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten I Un grupo de investigación descubre una nueva versión del enzima felicidasa, a la que denominan felicidasa*, que cataliza la siguiente reacción química

$$\text{FELIZ} \rightleftharpoons \text{TRISTE}$$

Los investigadores empiezan a caracterizar el enzima.

(a) En el primer experimento con una $[E_t]$ de 4 nM, encuentran que la V_{max} es de 1,6 $\mu\text{M s}^{-1}$. En base a este experimento, ¿Cuál es la k_{cat} de la felicidasa*? (Incluya las unidades adecuadas.)

(b) En otro experimento complementario con una $[E_t]$ de 1 nM y una [FELIZ] de 30 μM, los investigadores encuentran que $V_0 = 300 \text{ nM s}^{-1}$. ¿Cuál es la K_m de la felicidasa* para el sustrato FELIZ? (Incluya las unidades adecuadas.)

(c) Investigaciones posteriores indican que el enzima felicidasa* purificado y usado en los dos experimentos anteriores estaba contaminado con un inhibidor reversible llamado IRA. Cuando IRA se eliminaba con mucho cuidado de la preparación de felicidasa* y se repetían los dos experimentos, la V_{max} medida en (a) aumentaba hasta 4,8 $\mu\text{M s}^{-1}$, y la K_m medida en (b) pasaba a ser de 15 μM. Calcular los valores α y α' para el inhibidor IRA.

(d) En base a la información anterior, ¿Qué tipo de inhibidor es IRA?

10. Aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten II Se encuentra un enzima que cataliza la reacción

$$A \rightleftharpoons B$$

Los investigadores encuentran que la K_m para el sustrato A es 4 μM, y que la k_{cat} es 20 min^{-1}.

(a) En un experimento, [A] = 6 mM y V_0 = 480 nM min^{-1}. ¿Cuál era la $[E_t]$ usada en el experimento?

(b) En otro, $[E_t]$ = 0,5 μM, y la V_0 = 5 μM min^{-1}. ¿Cuál era la [A] usada en el experimento?

(c) Se observó que el compuesto Z es un inhibidor competitivo muy fuerte del enzima, con una α de 10. En un experimento con la misma $[E_t]$ que en (a), pero con diferente [A], se añade una cantidad de Z que reduce V_0 a 240 nM min^{-1}. ¿Cuál es la [A] usada en este experimento?

(d) En base a los parámetros cinéticos anteriores, ¿se puede decir que este enzima ha evolucionado hasta la perfección catalítica? Explique su razonamiento brevemente, usando el parámetro o los parámetros cinéticos que definen la perfección catalítica.

11. Cálculo de V_{max} y K_m por observación Aunque existen métodos gráficos para la determinación precisa de V_{max} y K_m de una reacción catalizada enzimáticamente (véase el Recuadro 6–1), a veces es posible calcular rápidamente estos valores mediante inspección de los valores de V_0 a [S] crecientes. Calcule el valor de V_{max} y K_m de la reacción catalizada enzimáticamente para la que se obtuvieron los datos siguientes:

[S] (M)	V_0 (μM/min)
$2{,}5 \times 10^{-6}$	28
$4{,}0 \times 10^{-6}$	40
1×10^{-5}	70
2×10^{-5}	95
4×10^{-5}	112
1×10^{-4}	128
2×10^{-3}	139
1×10^{-2}	140

12. Propiedades de un enzima de la síntesis de prostaglandinas Las prostaglandinas son un tipo de icosanoides, derivados de ácidos grasos con una variedad de efectos muy potentes en los tejidos de los vertebrados. Las prostaglandinas son las responsables de la producción de fiebre e inflamación y su dolor asociado. Derivan del ácido araquidónico, ácido graso de 20 carbonos en una reacción catalizada por el enzima prostaglandina endoperóxido sintasa. Este enzima, una cicloxigenasa, utiliza oxígeno para convertir el ácido araquidónico en PGG_2, precursor inmediato de muchas prostaglandinas diferentes (la síntesis de prostaglandinas se describe más adelante en el Capítulo 21).

(a) Los siguientes datos cinéticos son para la reacción catalizada por la prostaglandina endoperóxido sintasa. Observando las dos primeras columnas, determine la V_{max} y la K_m del enzima.

[Ácido araquidónico] (mM)	Velocidad de formación de PGG_2 (mM/min)	Velocidad de formación de PGG_2 con 10mg/mL de ibuprofeno (mM/min)
0,5	23,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	38,91

(b) El ibuprofeno es un inhibidor de la prostaglandina endoperóxido sintasa. El ibuprofeno reduce la inflamación y el dolor mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Utilizando los datos de la primera y la tercera columnas de la tabla, determine el tipo de inhibición que el ibuprofeno ejerce sobre la prostaglandina endoperóxido sintasa.

13. Análisis gráfico de V_{max} y K_m Estos datos experimentales se recogieron durante un estudio de la actividad catalítica de una peptidasa intestinal con el sustrato glicilglicina:

$$\text{Glicilglicina} + H_2O \longrightarrow 2\ \text{glicina}$$

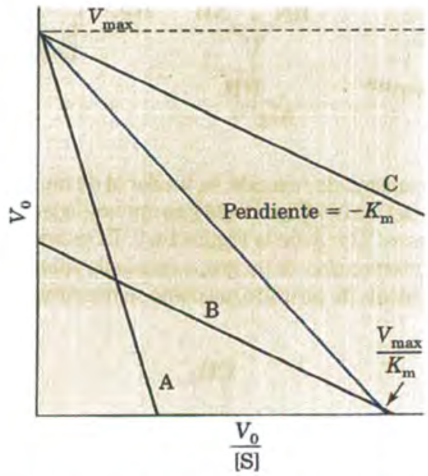
[S] (mM)	Producto formado (μmol/min)
1,5	0,21
2,0	0,24
3,0	0,28
4,0	0,33
8,0	0,40
16,0	0,45

A partir de estos datos, determínense por análisis gráfico (véase el Recuadro 6–1 y su gráfico dinámico asociado) los valores de V_{max} y K_m para esta preparación enzimática y su sustrato.

14. Ecuación de Eadie-Hofstee. La ecuación de Lineweaver-Burk, o de los dobles recíprocos, es una transformación de la ecuación de Michaelis-Menten. Multiplicando ambos lados de la ecuación de Lineweaver-Burk por V_{max} y reordenando se obtiene la ecuación de Eadie-Hofstee:

$$V_0 = (-K_m)\frac{V_0}{[S]} + V_{max}$$

En la gráfica siguiente se muestra una representación de V_0 frente a V_0/[S] para una reacción catalizada por un enzima. La curva azul se obtuvo en ausencia de inhibidor. ¿Cuál de las otras curvas (A, B, o C) muestra la actividad enzimática obtenida cuando se añade un inhibidor competitivo a la mezcla de reacción? Pista: Véase la ecuación 6–30.



15. Número de recambio de la carbónico anhidrasa La carbónico anhidrasa de los eritrocitos (M_r 30.000) tiene uno de los mayores números de recambio conocidos. Cataliza la hidratación reversible del CO_2:

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$$

Éste es un importante proceso en el transporte de CO_2 desde los tejidos a los pulmones. Si 10,0 μg de carbónico anhidrasa pura catalizan la hidratación de 0,30 g de CO_2 en 1 min a 37 °C y a V_{max}, ¿cuál es el número de recambio (k_{cat}) de la carbónico anhidrasa (en unidades de min^{-1})?

16. Deducción de la ecuación de velocidad de un inhibidor competitivo La ecuación de velocidad de un enzima sujeto a inhibición competitiva es

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]}$$

Empezando con una definición nueva del enzima total como

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI]$$

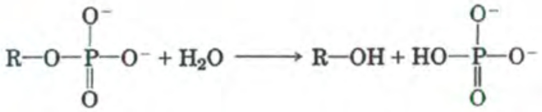
y las definiciones de α y K_I que se proporcionan en el texto, obtenga la ecuación anterior. Utilize como guía para la resolución la deducción de la ecuación de Michaelis-Menten.

17. Inhibición irreversible de un enzima Muchos enzimas son inhibidos de manera irreversible por iones de metales pesados tales como Hg^{2+}, Cu^{2+} o Ag^+, que pueden reaccionar con grupos sulfhidrilo esenciales formando mercapturos:

$$\text{Enz–SH} + Ag^+ \longrightarrow \text{Enz–S–Ag} + H^+$$

La afinidad de Ag^+ por los grupos sulfhidrilo es tan grande que se puede utilizar para valorar grupos –SH de manera cuantitativa. A 10,0 mL de una disolución que contiene 1,0 mg/mL de un enzima puro, un investigador le añade una cantidad suficiente de $AgNO_3$ para inactivar completamente el enzima. Hace falta un total de 0,342 μmol de $AgNO_3$. Calcule la masa molecular mínima del enzima. ¿Por qué el valor obtenido de esta forma sólo da la masa molecular *mínima*?

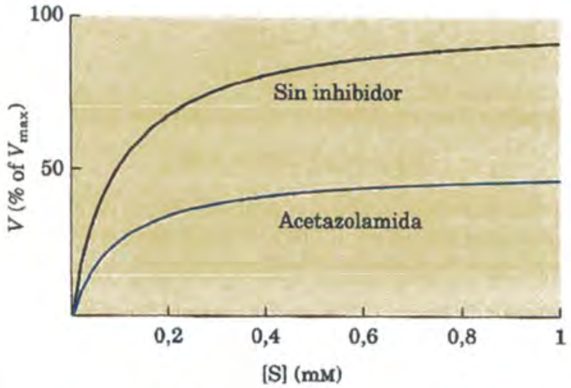
18. Aplicación clínica de la inhibición enzimática diferencial El suero sanguíneo humano contiene una clase de enzimas denominados fosfatasas ácidas que hidrolizan ésteres fosfato biológicos en condiciones ligeramente ácidas (pH 5,0):



Las fosfatasas ácidas son producidas por los eritrocitos, el hígado, bazo, riñón y glándula prostática. El enzima de la glándula prostática es importante en clínica porque un incremento de su actividad en la sangre puede ser un indicador de cáncer de próstata. La fosfatasa de la próstata es fuertemente inhibida por el ión tartrato mientras que las fosfatasas ácidas de los otros tejidos son insensibles al mismo. ¿Cómo se puede utilizar toda la información anterior para desarrollar un procedimiento específico para medir la actividad fosfatasa ácida de la glándula prostática en el suero sanguíneo humano?

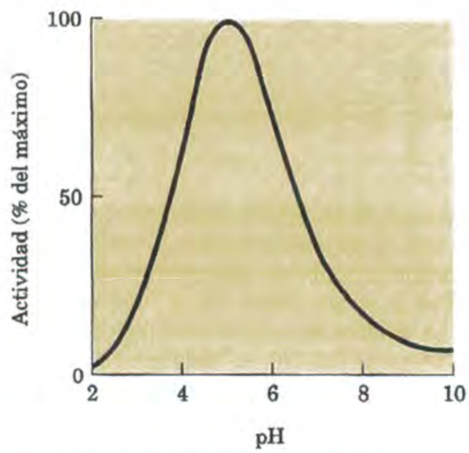
19. Inhibición de la carbónico anhidrasa por la acetazolamida La carbónico anhidrasa es fuertemente inhibida por el fármaco acetazolamida que se utiliza como diurético (incrementa la producción de orina) y para reducir la presión intraocular excesivamente elevada del glaucoma (producida por acumulación de líquido intraocular). La carbónico anhidrasa juega un papel importante en estos y en otros procesos secretores debido a que participa en la regulación del pH y del contenido de bicarbonato en una serie de fluidos corporales. La curva experimental de la velocidad de reacción inicial (dada aquí en forma de porcentaje de V_{max}) frente a [S] para la reac-

ción de la carbónico anhidrasa se ilustra en la figura (curva superior). Cuando se repite el experimento en presencia de acetazolamida se obtiene la curva inferior. A partir de la inspección de las curvas y de sus propios conocimientos de las propiedades cinéticas de los inhibidores enzimáticos competitivos y no competitivos, determine la naturaleza de la inhibición por la acetazolamida. Razone su respuesta.



20. Efectos de los inhibidores reversibles Obtenga la expresión que describe el efecto de un inhibidor reversible sobre la K_m observada (K_m aparente = $\alpha K_m/\alpha'$). Para ello empiece con la Ecuación 6–30 y con la definición de K_m como la [S] a la que $V_0 = V_{max}/2\,\alpha'$.

21. pH óptimo de la lisozima El sitio activo de la lisozima contiene dos residuos aminoácidos esenciales para la catálisis: Glu^{35} y Asp^{52}. Los valores de pK_a de los carboxilos de las cadenas laterales de estos residuos son 5,9 y 4,5, respectivamente. ¿Cuál es el estado de ionización (protonado o desprotonado) de cada residuo a pH 5,2, el pH óptimo de la lisozima? ¿De qué modo el estado de ionización de estos dos residuos aminoácidos puede explicar el perfil de actividad frente al pH de la lisozima que se muestra en la siguiente figura?



22. Trabajando con cinética Diríjase a los Gráficos animados del Capítulo 6.

(a) Utilizando el Gráfico Animado de la ecuación 6–9, elabore una gráfica de V frente a [S]. Use V_{max} = 100 μM s^{-1} y K_m = 10 μM. ¿Cuánto se incrementa V_0 cuando [S] aumenta el doble, desde 0,2 a 0,4 μM? ¿Cuánto es V_0 cuando [S] = 10 μM? ¿Cuánto se incrementa V_0 cuando [S] aumenta desde 100 a 200 μM? Observe el cambio en el gráfico cuando se doblan los valores de V_{max} o de K_m.

(b) Utilizando el Gráfico Animado de la ecuación 6–30 y los parámetros cinéticos que se han dado en (a), elabore una gráfica en la que tanto α como α' sean 1,0. Observe el cambio que se produce cuando α = 2,0; cuando α' = 3,0, y cuando α = 2,0 y α' = 3,0.

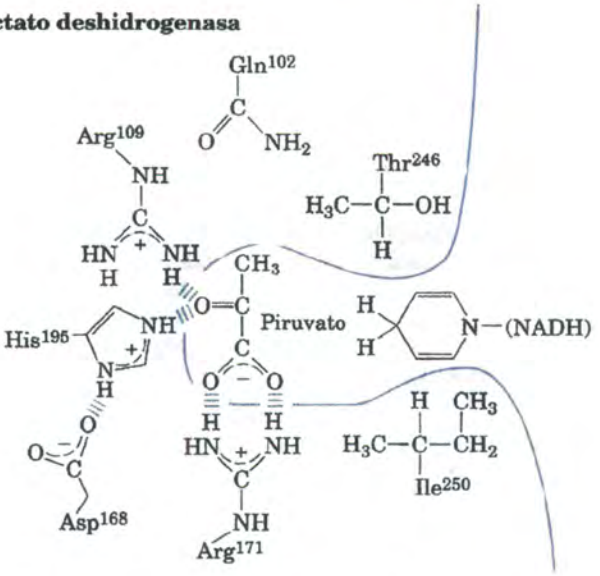
(c) Utilizando el Gráfico Animado de la ecuación 6–30 y la ecuación de Lineweaver-Burk del Recuadro 6–1, elabore una gráfica de Lineweaver-Burk (de dobles recíprocos) para todos los casos de (a) y de (b). Cuando α = 2,0, la intersección en el eje de las x, ¿se desplaza hacia la derecha o hacia la izquierda? Si α = 2,0 y α' = 3,0, la intersección en el eje de las x, ¿se desplaza hacia la derecha o hacia la izquierda?

Problema de análisis de datos

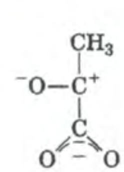
23. Exploración e ingeniería de la lactato deshidrogenasa El examen de la estructura de un enzima genera hipótesis sobre la relación entre diferentes aminoácidos de la estructura y la función de la proteína. Una manera de probar estas hipótesis consiste en el uso de la tecnología del DNA recombinante para generar versiones mutadas del enzima y poder examinar la estructura y la función de estas formas alteradas. La tecnología usada se describe en el Capítulo 9.

Un ejemplo de este tipo de análisis es el trabajo de Clarke y colaboradores sobre el enzima lactato deshidrogenasa, publicado en 1989. La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato con el NADH para formar lactato (véase la Sección 14.3). A continuación se muestra un esquema del centro activo del enzima; el piruvato está en el centro:

Lactato deshidrogenasa



El mecanismo de reacción es similar al de muchas reducciones a cargo del NADH (Fig. 13–24); es aproximadamente el inverso de los pasos ② y ③ de la Figura 14–7. El estado de transición implica la intervención de un grupo carbonilo altamente polarizado en la molécula de piruvato, tal como se muestra en el esquema inferior:



(a) Una forma mutante de la LDH en la que Arg^{109} es reemplazada por Gln muestra solamente un 5% de la capacidad de unión a piruvato y un 0,07% de la actividad del enzima salvaje. Proponga una explicación que resulte plausible para los efectos de esta mutación.

(b) Una forma mutante de la LDH con Arg^{171} reemplazada por Lys muestra sólo un 0,05% de la capacidad de unión a sustrato de la original. ¿Por qué sorprende este efecto tan grande?

(c) En la estructura cristalina de la LDH, el grupo guanidinio de la Arg^{171} y el grupo carboxilo del piruvato están alineados en una configuración coplanar en "horquilla". En base a esta observación, proponga una explicación plausible para el enorme efecto producido por la sustitución de Arg^{171} por Lys.

(d) Una forma mutante de la LDH en la que Ile^{250} es reemplazada por Gln reduce la capacidad de unión de NADH. Proponga una explicación plausible para este resultado.

Clarke y colaboradores también se propusieron obtener una versión mutante de LDH que uniera oxalacetato en lugar de piruvato. Llevaron a cabo una única sustitución, reemplazando Gln^{102} por Arg. El enzima resultante reducía el oxalacetato a malato y no lo hacía con el piruvato para pasar a lactato. Habían convertido, por tanto, LDH en malato deshidrogenasa.

(e) Dibuje el sitio activo de esta LDH mutante con el oxalacetato unido.

(f) Proponga una explicación plausible para el hecho de que este enzima mutante "prefiera" ahora el oxalacetato en lugar del piruvato.

(g) Los autores se sorprendieron de que la sustitución con un aminoácido más grande en el sitio activo permitiera la unión de un sustrato también mayor. Proponga una explicación plausible para este resultado.

Referencias

Clarke, A.R., Atkinson, T., & Holbrook, J.J. (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part I. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 101–105.

Clarke, A.R., Atkinson, T., & Holbrook, J.J. (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part II. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 145–148.

Sería más optimista acerca de un brillante futuro para el hombre si éste dedicara menos tiempo intentando dominar la naturaleza y más tiempo a disfrutar de sus dones y a respectar su dignidad.

—E.B. White, "Coon Tree", 1977

7

Glúcidos y glucobiología

Los glúcidos son las biomoléculas más abundantes de la Tierra. Cada año, la fotosíntesis convierte más de 100.000 millones de toneladas métricas de CO_2 y H_2O en celulosa y otros productos vegetales. Ciertos glúcidos (como el azúcar y el almidón) son fundamentales en la dieta humana en la mayor parte del mundo, y la oxidación de glúcidos es la principal ruta de obtención de energía en la mayoría de las células no fotosintéticas. Los polímeros insolubles de los glúcidos (también llamados glucanos) actúan como elementos estructurales y de protección en las paredes celulares de las bacterias y las plantas y en los tejidos conjuntivos de los animales. Otros polímeros de glúcidos lubrican las articulaciones óseas y participan en el reconocimiento y la adhesión intercelular. Los polímeros complejos de glúcidos, unidos covalentemente a proteínas o lípidos, actúan de señal de localización intracelular o de destino metabólico de estas moléculas híbridas denominadas **glucoconjugados.** En este capítulo se introducen las principales clases de glúcidos y glucoconjugados y se dan algunos ejemplos de los muchos papeles estructurales y funcionales que desempeñan.

Los glúcidos son polihidroxialdehídos o cetonas, o bien, sustancias cuya hidrólisis da lugar a estos compuestos. Muchos glúcidos, aunque no todos, poseen la fórmula empírica $(CH_2O)_n$; algunos glúcidos también contienen nitrógeno, fósforo o azufre.

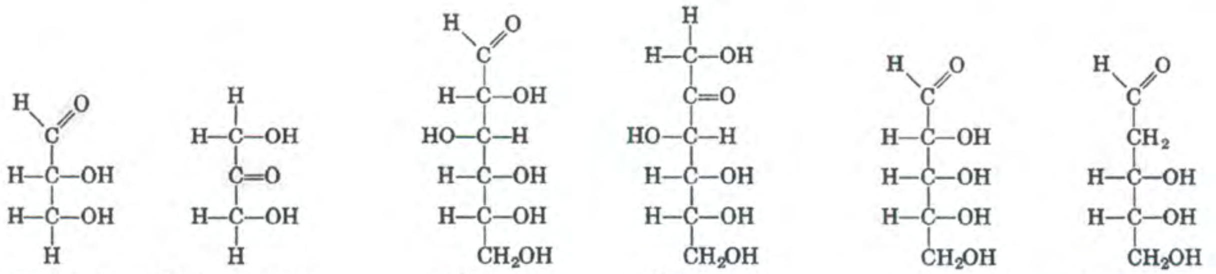
Existen tres clases principales de glúcidos según su tamaño: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (la palabra "sacárido" viene del griego *sakcharon*, que significa "azúcar"). Los **monosacáridos,** o azúcares simples, consisten en una sola unidad de polihidroxialdehído o cetona. El monosacárido más abundante en la naturaleza es la D-glucosa de seis átomos de carbono, a veces llamada dextrosa. Los monosacáridos de más de cuatro átomos de carbono suelen poseer estructuras cíclicas.

Los **oligosacáridos** consisten en cadenas cortas de unidades de monosacárido, o residuos, unidas por enlaces glucosídicos característicos. Los más abundantes son los **disacáridos,** formados por dos unidades de monosacárido. El más conocido es la sacarosa, o azúcar de caña, formado por los azúcares de seis carbonos D-glucosa y D-fructosa. Todos los monosacáridos y disacáridos comunes tienen nombres que terminan con el sufijo "-osa". La mayor parte de oligosacáridos con tres o más unidades de monosacárido no se encuentran libres en la célula sino unidos a otro tipo de moléculas (lípidos o proteínas) formando glucoconjugados.

Los **polisacáridos** son polímeros que contienen más de 20 unidades de monosacárido; algunos polisacáridos constan de centenares o millares de unidades de monosacárido. Algunos polisacáridos, como por ejemplo la celulosa, son cadenas lineales; otros, tales como el glucógeno, están ramificados. Tanto el glucógeno como la celulosa consisten en unidades repetitivas de D-glucosa, pero difieren en el tipo de enlace glucosídico y, en consecuencia, tienen propiedades y funciones biológicas notablemente diferentes.

7.1 Monosacáridos y disacáridos

Los glúcidos más simples, los monosacáridos, son aldehídos o cetonas, con dos o más grupos hidroxilo; los monosacáridos de seis carbonos glucosa y fructosa tienen cinco grupos hidroxilo. Una gran parte de los átomos de carbono a los que se unen los grupos hidroxilo son centros quirales que dan lugar a los muchos estereoisómeros de los azúcares que se encuentran en la naturaleza. Empezaremos describiendo las familias de monosacáridos que tienen entre tres y siete átomos de carbono: su estructura y formas estereoisoméricas y cómo se representan sobre el papel sus estructuras tridimensionales. A continuación discutiremos algunas reacciones químicas de los grupos carbonilo de los monosacáridos. Una de estas reacciones, la adición de un grupo hidroxilo de la misma molécula, genera las formas cíclicas de los azúcares de cinco y seis carbonos (que predominan en disolución acuosa) y da lugar a la aparición de un nuevo centro quiral, que incrementa la complejidad estereoquímica de estos compuestos. Por tanto, se describirá con cierto detalle la nomenclatura usada para especificar sin ambigüedad la configuración adoptada alrededor de cada átomo de carbono en la forma cíclica y la manera de representar estas estructuras sobre



Gliceraldehído, una aldotriosa — Dihidroxiacetona, una cetotriosa (a)

D-Glucosa, una aldohexosa — D-Fructosa, una cetohexosa (b)

D-Ribosa, una aldopentosa — 2-Desoxi-D-ribosa, una aldopentosa (c)

FIGURA 7–1 Monosacáridos representativos. (a) Dos triosas, una aldosa y una cetosa. El grupo carbonilo de cada una está sombreado. **(b)** Dos hexosas comunes. **(c)** Las pentosas que forman parte de los ácidos nucleicos. La D-ribosa es un componente del ácido ribonucleico (RNA) y la 2-desoxi-D-ribosa es un componente del ácido desoxirribonucleico (DNA).

el papel; esta información será de utilidad para la discusión del metabolismo de los monosacáridos en la Parte II. También presentamos aquí algunos derivados importantes de los monosacáridos que encontraremos en capítulos posteriores.

Las dos familias de monosacáridos son las aldosas y las cetosas

Los monosacáridos son sólidos incoloros y cristalinos, solubles en agua e insolubles en disolventes no polares. La mayoría tienen sabor dulce. El esqueleto de los monosacáridos comunes consiste en una cadena de carbonos sin ramificar en la que todos los átomos de carbono están unidos por enlaces sencillos. En las formas de cadena abierta, uno de los átomos de carbono está unido a un átomo de oxígeno por un doble enlace, formando un grupo carbonilo; cada uno de los demás átomos de carbono tiene un grupo hidroxilo. Si el grupo carbonilo se halla en un extremo de la cadena carbonada, es un grupo aldehído y el monosacárido recibe el nombre de **aldosa;** si el grupo carbonilo está en otra posición, es un grupo cetona y el monosacárido se denomina **cetosa.** Los monosacáridos más sencillos son las dos triosas de tres átomos de carbono: el gliceraldehído, una aldotriosa, y la dihidroxiacetona, una cetosa **(Fig. 7–1a).**

Los monosacáridos que poseen cuatro, cinco, seis y siete átomos de carbono en su cadena carbonada se denominan, respectivamente, tetrosas, pentosas, hexosas y heptosas. Existen aldosas y cetosas para cada una de estas longitudes de cadena: aldotetrosas y cetotetrosas, aldopentosas y cetopentosas, y así sucesivamente. Las hexosas, entre las que se cuentan la aldohexosa D-glucosa y la cetohexosa D-fructosa (Fig. 7–1b), son los monosacáridos más comunes en la naturaleza. Las aldopentosas D-ribosa y 2-desoxi-D-ribosa (Fig. 7–1c) son componentes de los nucleótidos y los ácidos nucleicos (Capítulo 8).

Los monosacáridos tienen centros asimétricos

Todos los monosacáridos excepto la dihidroxiacetona contienen uno o más átomos de carbono asimétricos (quirales) y, por lo tanto, se encuentran en formas isoméricas ópticamente activas (pp. 16–17). La aldosa más sencilla, el gliceraldehído, contiene un centro quiral (el átomo de carbono central) y tiene, por tanto, dos isómeros ópticos, o **enantiómeros,** diferentes **(Fig. 7–2).**

CONVENCIÓN CLAVE: Por convención, uno de estos dos enantiómeros se denomina isómero D y el otro isómero L. Como ocurre con otras biomoléculas con centros quirales, la configuración absoluta de los azúcares se ha determinado por cristalografía de rayos X. Para representar sobre el papel la estructura tridimensional de los azúcares se suelen emplear las **fórmulas de proyección de Fischer** (Fig. 7–2); los enlaces horizontales se proyectan fuera del plano del papel hacia el lector y los enlaces verticales se proyectan por detrás del plano del papel alejándose del lector.

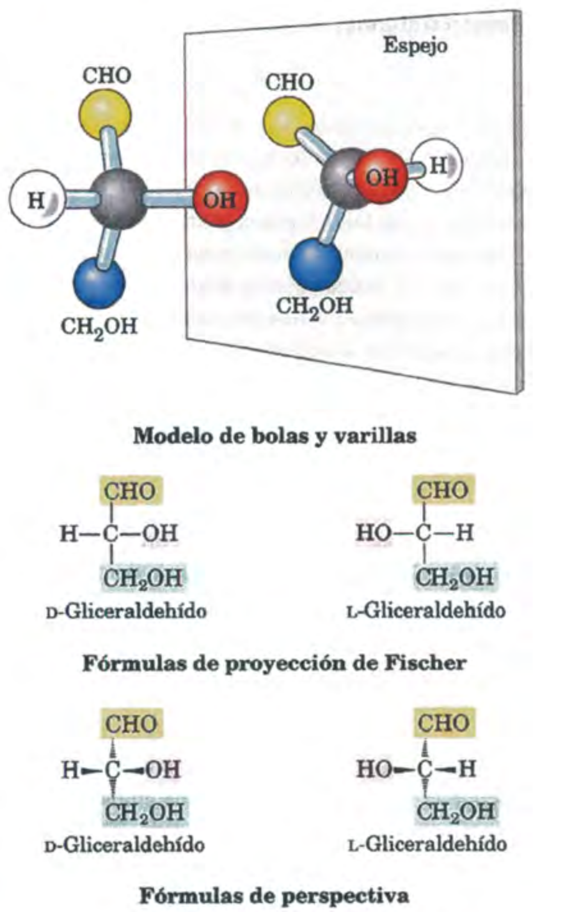
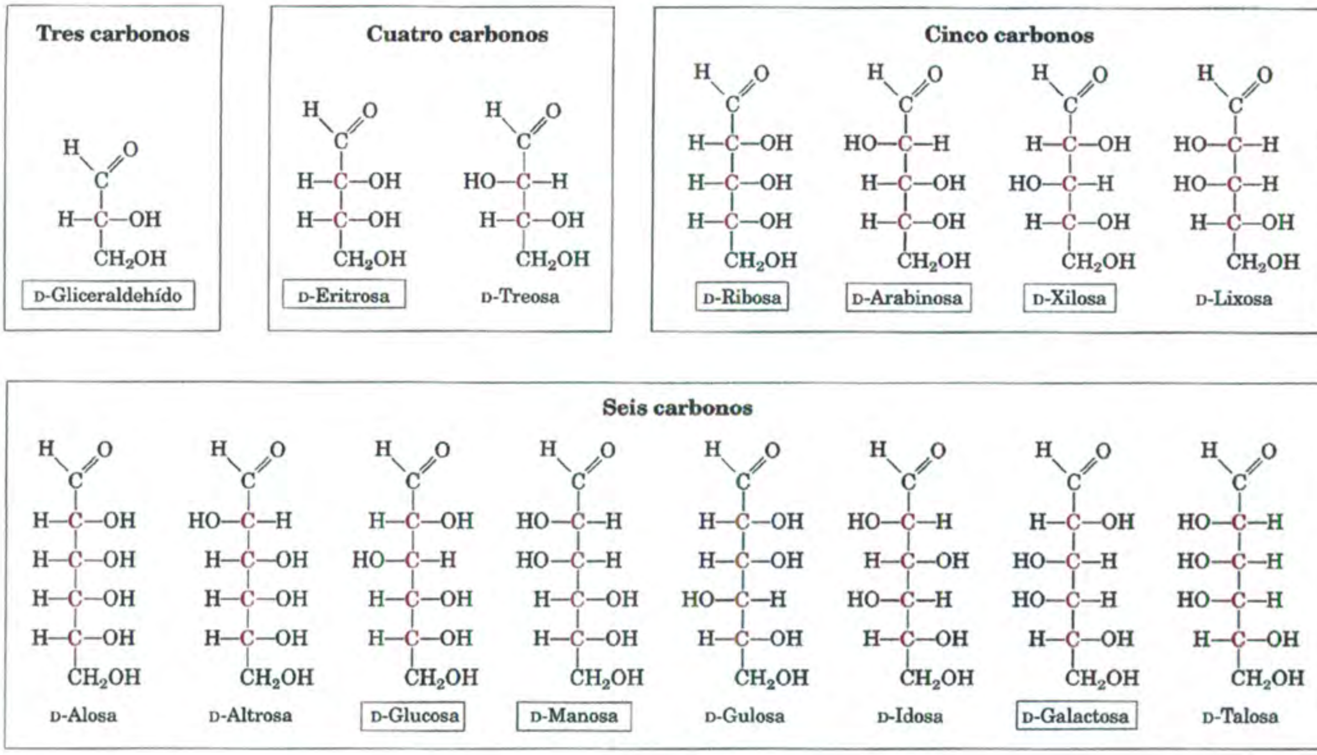
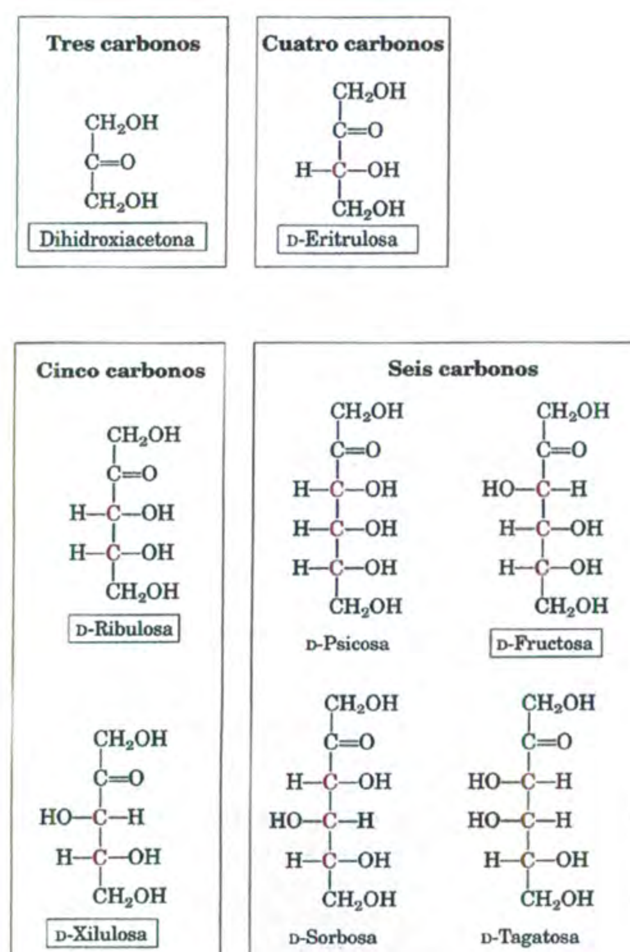


FIGURA 7–2 Tres modos de representar los dos estereoisómeros del gliceraldehído. Los enantiómeros son imágenes especulares uno de otro. Los modelos de bolas y varillas muestran la configuración real de las moléculas. Recuerde (véase la Fig. 1–17) que en las fórmulas de perpectiva, los enlaces representados con una cuña sólida se proyectan hacia el lector, mientras que las cuñas discontinuas apuntan en sentido opuesto.



D-Aldosas
(a)

FIGURA 7–3 Aldosas y cetosas. Las series de **(a)** D-aldosas y **(b)** D-cetosas que tienen entre tres y seis átomos de carbono se presenta como fórmulas de proyección. Los átomos de carbono marcados en rojo son centros quirales. En todos estos isómeros D, el carbono quiral *más distante del carbono carbonílico* tiene la misma configuración que el carbono quiral del D-gliceraldehído. Los azúcares cuyos nombres están encuadrados son los más abundantes en la naturaleza; los encontraremos más tarde en éste y en posteriores capítulos.



D-Cetosas
(b)

En general, una molécula con n centros quirales puede tener 2^n estereoisómeros. El gliceraldehído tiene $2^1 = 2$; las aldohexosas, con cuatro centros quirales, tienen $2^4 = 16$ estereoisómeros. Los estereoisómeros de los monosacáridos de cada una de las longitudes de cadena de átomos de carbono pueden dividirse en dos grupos, que difieren entre ellos en la configuración alrededor del centro quiral *más distante* del grupo carbonilo. Aquellos cuya configuración en este carbono de referencia sea la misma que en el D-gliceraldehído se denominan isómeros D, mientras que los que tengan la misma configuración que el L-gliceraldehído son los isómeros L. Cuando el grupo hidroxilo del átomo de carbono de referencia se halla en el lado derecho en la fórmula de proyección, el azúcar es un isómero D; cuando está a la izquierda es un isómero L. De las 16 aldohexosas posibles, 8 son D y 8 L. La mayor parte de las hexosas presentes en los seres vivos son isómeros D.

La **Figura 7–3** muestra las estructuras de los estereoisómeros D de todas las aldosas y cetosas que tienen de tres a seis átomos de carbono. Los átomos de carbono de un azúcar se numeran empezando por el extremo de la cadena más próximo al grupo carbonilo. Cada una de las ocho D-aldohexosas, que se diferencian por su estereoquímica en los carbonos C-2, C-3 o C-4, posee su propio nombre: D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, etc. (Fig. 7–3a). Las cetosas de cuatro y cinco átomos de carbono se

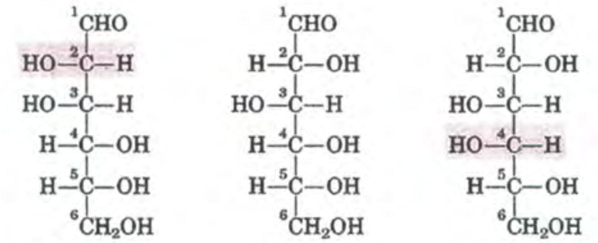


FIGURA 7–4 Epímeros. La D-glucosa y dos de sus epímeros se muestran con fórmulas de proyección. Cada epímero difiere de la D-glucosa en la configuración de un solo centro quiral (sombreado en rojo).

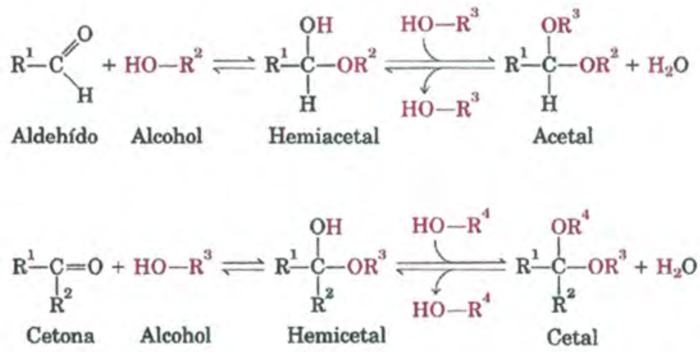
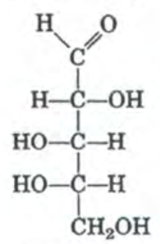


FIGURA 7–5 Formación de hemiacetales y hemicetales. Un aldehído o una cetona pueden reaccionar con un alcohol en relación 1:1 para dar lugar, respectivamente, a un hemiacetal o un hemicetal, lo que origina un nuevo centro quiral en el carbono carbonílico. La adición de una segunda molécula de alcohol da lugar a la formación de un acetal o un cetal. Cuando el segundo alcohol forma parte de otra molécula de azúcar, el enlace formado es un enlace glucosídico (pág. 243).

denominan insertando el infijo "ul" en el nombre de la aldosa correspondiente; por ejemplo, la D-ribulosa es la cetopentosa que corresponde a la aldopentosa D-ribosa. Las cetohexosas se nombran de otra forma; por ejemplo, la fructosa (del latín *fructus*, que significa "fruta"; la fruta contiene importantes cantidades de este azúcar) y la sorbosa (de *Sorbus*, un género de arbusto de montaña, cuyas bayas son ricas en el azúcar relacionado con el alcohol sorbitol). Cuando dos azúcares difieren tan sólo en la configuración alrededor de un átomo de carbono, se denominan **epímeros;** la D-glucosa y la D-manosa, que únicamente difieren en la estereoquímica en C-2, son epímeros, lo mismo que la D-glucosa y la D-galactosa (que difieren en C-4) **(Fig. 7-4)**.

Algunos azúcares se encuentran en la naturaleza en forma L; como ejemplos tenemos la L-arabinosa y los isómeros L de algunos derivados de azúcares que son componentes habituales de los glucoconjugados (Sección 7.3).



L-Arabinosa

Los monosacáridos comunes tienen estructura cíclica

Hasta ahora hemos representado las estructuras de aldosas y cetosas en forma de cadenas lineales en aras de la simplicidad (Figs. 7–3 y 7–4). No obstante, las aldotetrosas y todos los monosacáridos con cinco o más átomos de carbono en su cadena suelen encontrarse en disolución acuosa en forma de estructuras cíclicas (en anillo), en las que el grupo carbonilo ha formado un enlace covalente con el oxígeno de un grupo hidroxilo perteneciente a la misma cadena. La formación de estas estructuras en anillo es el resultado de una reacción general entre los alcoholes y los aldehídos o las cetonas para formar los derivados denominados **hemiacetales** o **hemicetales (Fig. 7–5)**, que contienen un átomo de carbono asimétrico adicional y pueden, por tanto, existir en dos formas estereoisoméricas. Por ejemplo, la D-glucosa se presenta en disolución como un hemiacetal intramolecular en el que el grupo hidroxilo libre en C-5 ha reaccionado con el C-1 aldehídico, que se convierte en asimétrico y da lugar a los estereoisómeros designados como α y β **(Fig. 7–6)**. La designación α indica que el grupo hidroxilo en el centro anomérico, en una proyección de Fischer se encuentra en el mismo lado que el hidroxilo unido al centro quiral más lejano, mientras que β indica que estos grupos hidroxilo se en-

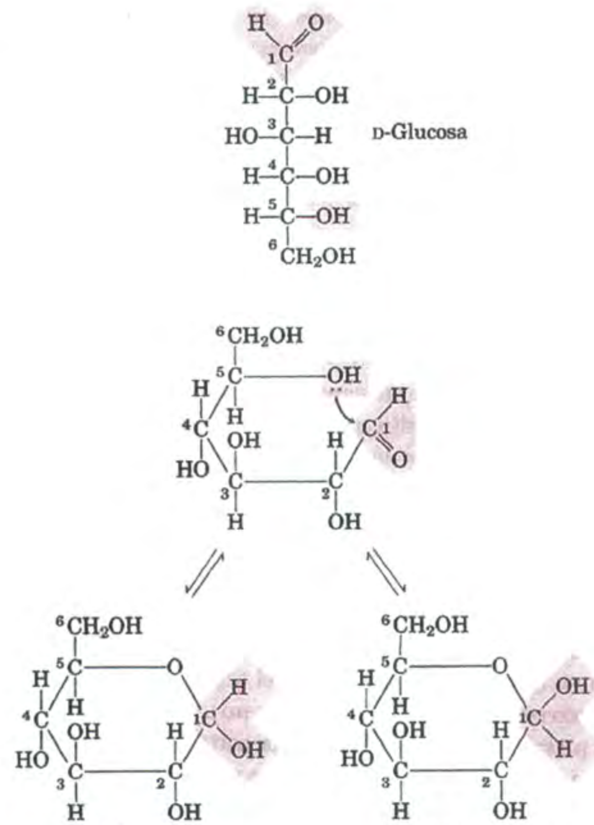


FIGURA 7–6 Formación de las dos formas cíclicas de la D-glucosa. Cuando el grupo aldehído en C-1 y el grupo hidroxilo en C-5 reaccionan para formar un enlace hemiacetálico, se pueden producir dos estereoisómeros, los anómeros α y β, que difieren únicamente en la estereoquímica del carbono hemiacetálico. La interconversión de los anómeros α y β se denomina mutarrotación.

cuentran en lados opuestos. Estos compuestos cíclicos de seis átomos se denominan **piranosas** porque son similares al compuesto cíclico con un anillo de seis átomos denominado pirano **(Fig. 7–7)**. Los nombres sistemáticos de las dos formas cíclicas de la D-glucosa son α-D-glucopiranosa y β-D-glucopiranosa.

Las aldosas también presentan formas cíclicas con anillos de cinco átomos que por su similitud con el compuesto cíclico furano, formado por un anillo de cinco átomos, se denominan **furanosas.** Sin embargo, el anillo de seis átomos de aldopiranosa es mucho más estable que el anillo de aldofuranosa y es predominante en las soluciones de aldohexosas y aldopentosas. Únicamente las aldosas que tienen cinco o más átomos de carbono pueden formar anillos de piranosa.

Las formas isoméricas de los monosacáridos que difieren entre sí únicamente en la configuración alrededor del átomo de carbono hemiacetálico o hemicetálico se denominan **anómeros.** El átomo de carbono hemiacetálico (o carbonílico) se denomina **carbono anomérico.** Los anómeros α y β de la D-glucosa se interconvierten en solución acuosa mediante un proceso denominado **mutarrotación** (Fig. 7-6). De este modo, una solución de α-D-glucosa y una solución de β-D-glucosa dan lugar finalmente a mezclas idénticas en el equilibrio que tienen las mismas propiedades ópticas. Esta mezcla está formada por aproximadamente un tercio de β-D-glucosa, dos tercios de α-D-glucosa y una proporción muy pequeña de las formas lineal y cíclica de cinco átomos (glucofuranosa).

Las cetohexosas se encuentran también en sus formas anoméricas α y β. En estos compuestos el grupo hidroxilo en C-5 (o C-6) reacciona con el grupo cetona en C-2, formando un anillo de furanosa (o de piranosa) que contiene un enlace de tipo hemicetal (Fig. 7–5). La D-fructosa forma fácilmente el anillo de furanosa (Fig. 7–7); la forma anómerica más común de este azúcar tanto combinada como en derivados es la β-D-fructofuranosa.

Las **fórmulas en perspectiva de Haworth** tales como las mostradas en la Fig. 7–7, se emplean normalmente para representar las estructuras cíclicas de los monosacáridos. No obstante, el anillo de piranosa de seis átomos no es en realidad plano, tal como podrían sugerir las perspectivas de Haworth, sino que tiende a asumir una de las dos conformaciones en "silla" **(Fig. 7–8)**. Recuérdese del Capítulo 1 (p. 18) que dos *conformaciones* de una molécula son interconvertibles sin necesidad de proceder a la rotura de ningún enlace, mientras que dos *configuraciones* sólo pueden interconvertirse después de la rotura de un enlace covalente. Para interconvertir las configuraciones α y β, ha de romperse el enlace en el que participa el átomo de oxígeno del anillo mientras que la interconversión de las dos formas en silla no requiere rotura de enlace. Veremos más adelante que las estructuras tridimensionales específicas de las unidades de monosacárido son importantes en la determinación de las propiedades biológicas y función de algunos polisacáridos.

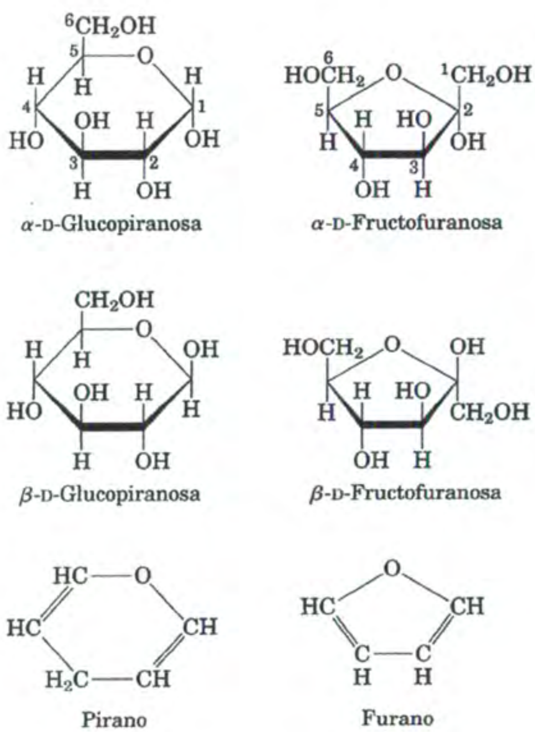


FIGURA 7–7 Piranosas y furanosas. Fórmulas de perspectiva de Haworth de las formas piranosa de la D-glucosa y furanosa de la D-fructosa. Los lados (enlaces) del anillo más cercanos al lector se representan con trazos gruesos. Los grupos hidroxilo por debajo del plano del anillo en las perspectivas de Haworth se encuentran a la derecha en las proyecciones de Fischer (compare esta figura con la Fig. 7–6). Como referencia se muestran las estructuras del pirano y el furano.

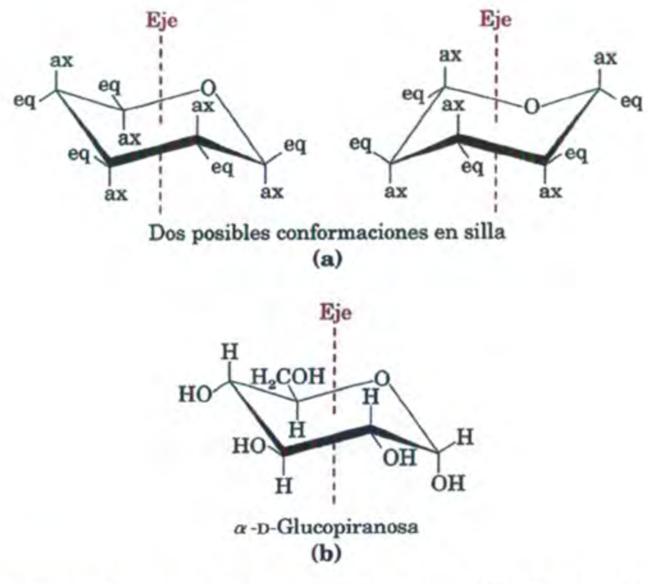


FIGURA 7–8 Fórmulas conformacionales de las piranosas. (a) Dos formas conformacionales en silla del anillo de piranosa. Los enlaces con los sustituyentes y átomos de hidrógeno de los carbonos del anillo pueden ser axiales (ax), que se proyectan casi paralelamente al eje vertical del anillo, o ecuatoriales (eq), que se proyectan de modo aproximadamente perpendicular con respecto al mismo eje. Dos *confórmeros* tales como los mostrados no se convierten fácilmente sin romper el anillo. Sin embargo, cuando se "estira" la molécula (mediante microscopia de fuerza atómica; véase el Recuadro 11–1) una incorporación de unos 46 kJ de energía por mol de azúcar puede forzar la interconversión de las formas en silla. Normalmente los sustituyentes en posición ecuatorial sufren menores impedimentos estéricos por parte de los sustituyentes cercanos, por lo que están favorecidos los confórmeros con sustituyentes voluminosos en posición ecuatorial. Otra conformación, en "nave" (no mostrada), sólo se observa en derivados con sustituyentes muy voluminosos. **(b)** Conformación en silla preferida de la α-D-glucopiranosa.

Los organismos contienen numerosos derivados de las hexosas

Además de las hexosas simples como la glucosa, la galactosa y la manosa, existen una serie de derivados de los azúcares en los que un grupo hidroxilo del compuesto original está reemplazado por otros sustituyentes o bien uno de los átomos de carbono se encuentra oxidado en forma de grupo carboxílico **(Fig. 7–9)**. En la glucosamina, la galactosamina y la manosamina, el grupo hidroxilo en C-2 del compuesto original se halla reemplazado por un grupo amino. El grupo amino casi siempre está condensado con ácido acético, tal como sucede en el caso de la *N*-acetilglucosamina. Este derivado de la glucosamina forma parte de muchos polímeros estructurales, entre los que se encuentran los de la pared de la célula bacteriana. Las paredes de las células bacterianas también contienen un derivado de la glucosamina, el ácido *N*-acetilmurámico, en el que el ácido láctico (un ácido carboxílico de tres átomos de carbono) está unido mediante un enlace éter con el oxígeno en C-3 de la *N*-acetilglucosamina. La sustitución del grupo hidroxilo en C-6 de la L-galactosa o la L-manosa por un hidrógeno da lugar a L-fucosa y L-ramnosa, respectivamente. La L-fucosa se encuentra en los oligosacáridos complejos de glucoproteínas y glucolípidos; la L-ramnosa se encuentra en los polisacáridos de plantas.

Cuando el carbono carbonílico (aldehídico) de la glucosa se oxida a nivel de carboxilo se produce ácido glucónico; otras aldosas dan lugar a otros **ácidos aldónicos.** La oxidación del carbono del otro extremo de la cadena (el C-6 de glucosa, galactosa o manosa) da lugar al correspondiente **ácido urónico:** glucurónico, galacturónico o manurónico. Tanto los ácidos aldónicos como los urónicos forman ésteres intramoleculares estables denominados lactonas (Fig. 7–9, abajo a la izquierda). Además de estos derivados de las hexosas, merece destacarse un azúcar acídico de nueve átomos de carbono: el ácido *N*-acetilneuramínico (un ácido siálico, si bien se le conoce simplemente como "ácido siálico"), un derivado de la

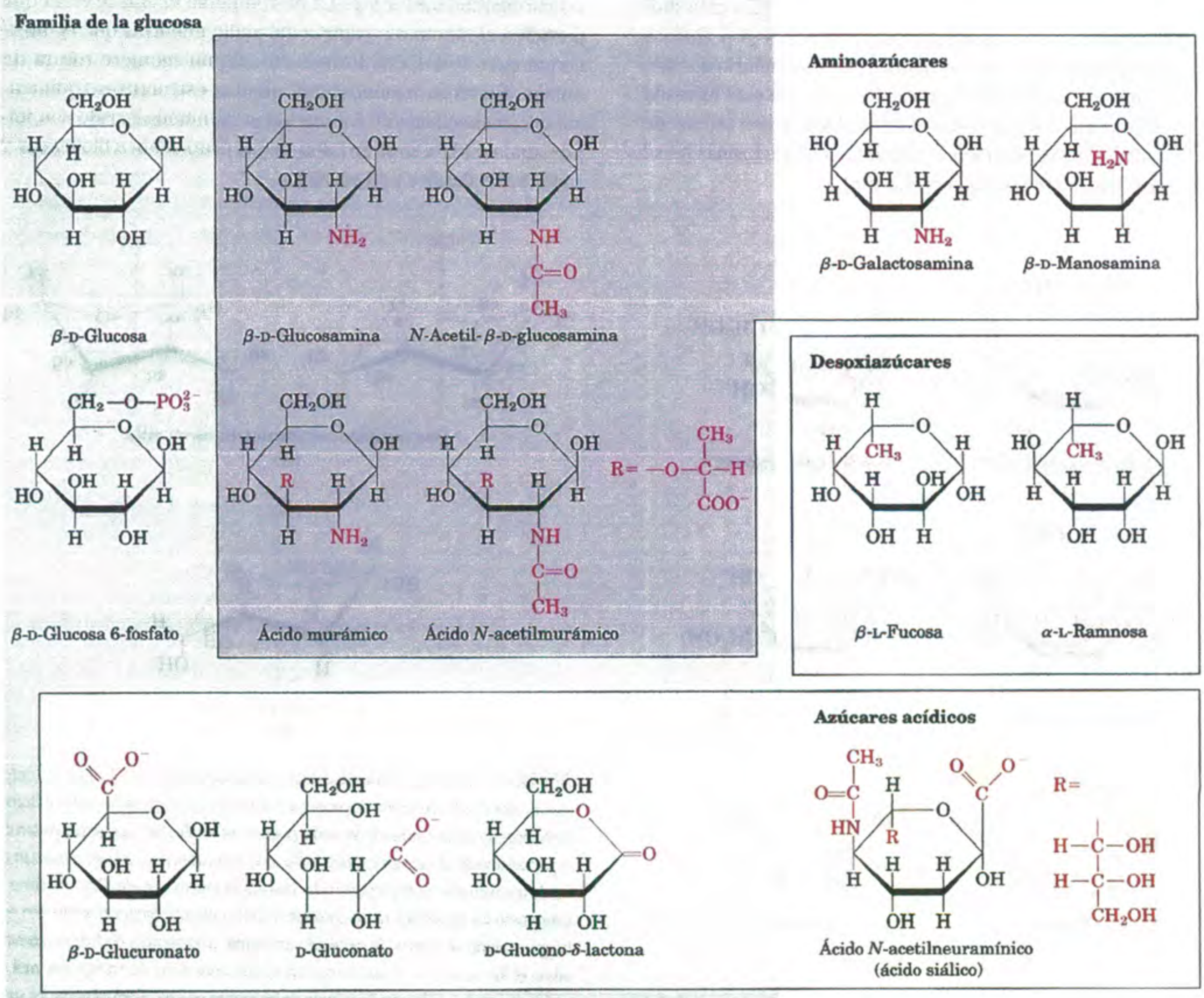


FIGURA 7–9 Algunos derivados de las hexosas de importancia en biología. En los aminoazúcares, un grupo —NH_2 reemplaza a uno de los grupos —OH de la hexosa original. La sustitución de un —OH por un —H da lugar a un desoxiazúcar. Obsérvese que los desoxiazúcares mostrados aquí se encuentran en la naturaleza en forma de isómeros L. Los azúcares acídicos contienen un grupo carboxilato, que les confiere una carga negativa a pH neutro. La D-glucono-δ-lactona se forma a partir de ácido glucónico por formación de un enlace éster entre el grupo carboxilato en C-1 y el grupo hidroxilo en C-5 (también llamado carbono δ) del D-gluconato.

N-acetilmanosamina, es un componente de muchas glucoproteínas y glucolípidos de animales. Los grupos ácido carboxílico de estos derivados acídicos de azúcares están ionizados a pH 7 y, por tanto, estos compuestos se pueden denominar correctamente como carboxilatos (glucuronato, galacturonato, etc.)

En la síntesis y metabolismo de glúcidos los intermedios no suelen ser los mismos azúcares, sino sus derivados fosforilados. La condensación del ácido fosfórico con uno de los grupos hidroxilo de un azúcar da lugar a un éster fosfato, como, por ejemplo, la glucosa 6-fosfato (Fig. 7–9). Los fosfatos de azúcares son relativamente estables a pH neutro y tienen una carga negativa. Uno de los efectos de la fosforilación de los azúcares en las células es su retención en el interior de las mismas; en general, las células no poseen transportadores en la membrana plasmática que permitan el paso de los azúcares fosforilados. La fosforilación también activa a los azúcares para su posterior transformación química. Algunos derivados fosforilados importantes de los azúcares son componentes de los nucleótidos (tratados en el capítulo siguiente).

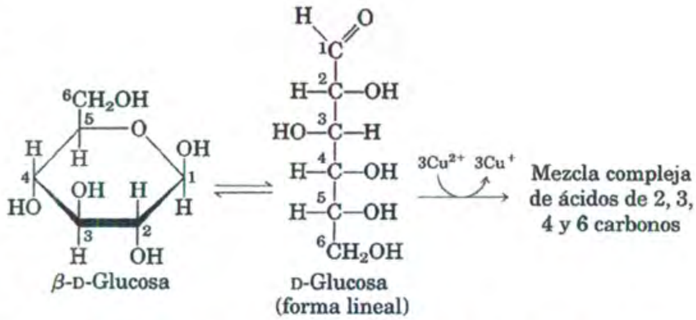


FIGURA 7–10 Los azúcares como agentes reductores. La oxidación del carbono anomérico (y probablemente del carbono adyacente) de la glucosa y otros azúcares en condiciones alcalinas es la base de la reacción de Fehling. El ión cuproso (Cu^+) producido forma un precipitado rojizo de óxido cuproso. En la forma de hemiacetal (cíclica), el C-1 de la glucosa no puede ser oxidado por el Cu^{2+}. Sin embargo, al encontrarse la forma cíclica en equilibrio con la forma de cadena abierta, la reacción de oxidación puede finalmente completarse. La reacción con el Cu^{2+} es compleja dando una mezcla de productos al tiempo que se reducen 3 moles de Cu^{2+} por mol de glucosa.

Los monosacáridos son agentes reductores

Los monosacáridos pueden ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves tales como el ion cúprico (Cu^{2+}) **(Fig. 7–10)**. El carbono carbonílico se oxida a grupo carboxílico. La glucosa y otros azúcares capaces de reducir iones cúpricos se denominan **azúcares reductores.** Forman enedioles, que se convierten en ácidos aldónicos y, a continuación, en una mezcla compleja de ácidos de 2, 3, 4 y 6 átomos de carbono. Esta propiedad es la base de la reacción de Fehling, un ensayo cualitativo que indica la presencia de azúcares reductores. También es posible estimar la concentración del azúcar a partir de la medición de la cantidad de agente oxidante que se reduce por la acción de una solución de azúcar. Durante muchos años se utilizó este procedimiento para la determinación de niveles elevados de glucosa en sangre y orina en el diagnóstico de la diabetes mellitus (Recuadro 7–1). ■

RECUADRO 7–1 MEDICINA Determinación de la glucosa sanguínea en el diagnóstico y el tratamiento de la diabetes

La glucosa es el principal combustible del cerebro. Cuando la cantidad de glucosa que llega al cerebro es demasiado baja, las consecuencias pueden ser espantosas: letargia, coma, lesión cerebral permanente y muerte (véase la Fig. 23–25). Los animales han desarrollado mecanismos hormonales complejos para asegurar que la concentración de glucosa en la sangre permanece suficientemente elevada (alrededor de 5 mM) para satisfacer las necesidades del cerebro, pero no demasiado elevada porque una concentración de glucosa en sangre elevada puede tener consecuencias fisiológicas graves.

Los individuos con diabetes mellitus dependiente de insulina no producen suficiente insulina, la hormona utilizada para reducir la concentración de glucosa en sangre, y si no se trata la diabetes la concentración de glucosa en sangre puede ser varias veces superior a la normal. Se cree que estos elevados niveles de glucosa son, al menos, una de las causas de las graves consecuencias a largo plazo de la diabetes no tratada (fallo renal, enfermedad cardiovascular, ceguera y deficiente curación de las heridas), por lo que uno de los objetivos de la terapia es proporcionar la insulina suficiente (por inyección) para mantener a nivel normal la concentración de glucosa en la sangre. Para mantener el equilibrio correcto de ejercicio, dieta e insulina para cada individuo, se ha de medir varias veces al día la concentración de glucosa sanguínea de modo que se pueda ajustar adecuadamente la cantidad de insulina.

Se puede determinar la concentración de glucosa en la sangre y en la orina mediante un ensayo sencillo para los azúcares reductores tal como la reacción de Fehling que, durante muchos años, se ha utilizado como prueba diagnóstica de la diabetes (Fig. 7–10). Las determinaciones modernas requieren tan sólo una gota de sangre que se coloca sobre un tira de ensayo que contiene el enzima glucosa oxidasa (Fig. 1); un fotómetro sencillo mide el color formado cuando el H_2O_2 producido en la oxidación de la glucosa reacciona con un colorante y da el resultado de la concentración de glucosa sanguínea.

Dado que la concentración de glucosa en sangre cambia con el horario de las comidas y del ejercicio, una única medida no refleja necesariamente el *promedio* de la glucosa sanguínea durante horas o días, por lo que elevaciones peligrosas pueden pasar desapercibidas. Se puede evaluar la concentración de glucosa media analizando su efecto sobre la hemoglobina, la proteína transportadora de oxígeno en los eritrocitos (p. 158).

$$\text{D-Glucosa} + O_2 \xrightarrow{\text{glucosa oxidasa}} \text{D-Glucono-}\delta\text{-lactona} + H_2O_2$$

FIGURA 1 Reacción de la glucosa oxidasa utilizada en la determinación de la glucosa en sangre. Un segundo enzima, una peroxidasa, cataliza la reacción del H_2O_2 con un compuesto incoloro para dar un producto coloreado que se mide espectrofotométricamente.

(*continúa en la página siguiente*)

RECUADRO 7–1 MEDICINA Determinación de la glucosa sanguínea en el diagnóstico y el tratamiento de la diabetes (continuación de la página anterior)

Transportadores presentes en la membrana del eritrocito equilibran las concentraciones de glucosa intracelular y plasmática de modo que la hemoglobina está expuesta constantemente a la glucosa sea cual sea la concentración en la sangre. Se produce una reacción no enzimática entre la glucosa y los grupos amino primarios de la hemoglobina (ya sea la Val amino-terminal o los grupos ε-amino de los residuos de Lys; véase la Fig. 2). La velocidad de este proceso es proporcional a la concentración de glucosa, de modo que la reacción puede utilizarse para calcular la concentración de glucosa sanguínea media durante semanas. La cantidad de hemoglobina glucada (GHB) presente en un momento dado refleja el promedio de la concentración de glucosa sanguínea durante el "tiempo de vida" circulante del eritrocito (unos 120 días) si bien la concentración durante las dos últimas semanas es la más importante para dar el valor de GHB.

La magnitud de la **glucación** (así llamada para distinguirla de la glucosilación que es la *transferencia enzimática* de glucosa a una proteína) **de la hemoglobina** se mide clínicamente mediante extracción de la hemoglobina de una pequeña muestra de sangre y separando electroforéticamente la GHB de la hemoglobina sin modificar, basándose en la diferencia de carga resultado de la modificación del grupo o grupos amino. Los valores normales de GHB son de alrededor del 5% de la hemoglobina total (que corresponde a una glucosa sanguínea de 120 mg/100 mL). Sin embargo, en las personas con diabetes no tratada el valor puede llegar hasta el 13%, que indica una concentración media de glucosa en sangre de unos 300 mg/100 mL, lo que es peligrosamente elevado. Un criterio sobre el éxito de un programa individual de terapia con insulina (el espaciamiento temporal, la frecuencia y la cantidad de insulina inyectada) es el del mantenimiento de la GHB en valores aproximados del 7%.

En la reacción de glucación de la hemoglobina, el primer paso (formación de una base de Schiff) va seguido de una serie de reordenamientos, oxidaciones y deshidrataciones de la porción glucídica que da lugar a una mezcla heterogénea de AGE (del inglés *a*dvanced *g*lycation *e*nd products). Estos productos pueden abandonar el eritrocito y formar entrecruzamientos covalentes entre proteínas que interfieren con la función normal de las proteínas (Fig. 2). La acumulación de concentraciones relativamente elevadas de AGE en personas con diabetes puede, por entrecruzamiento de proteínas importantes, ser causa de las lesiones de riñones, retinas y sistema cardiovascular que son características de la enfermedad. Este proceso patogénico constituye una diana potencial para la acción medicamentosa.

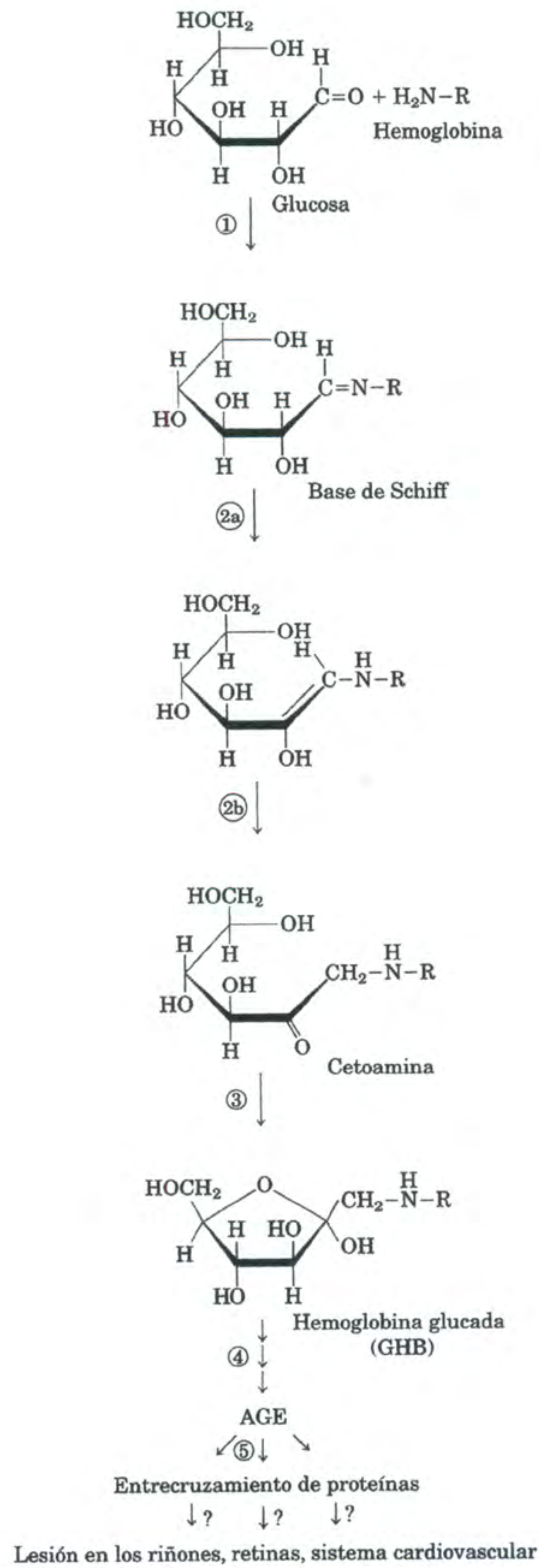


FIGURA 2 La reacción no enzimática de la glucosa con un grupo amino primario de la hemoglobina empieza con ① formación de una base de Schiff, la cual ② experimenta el reordenamiento de Amadori que genera un producto estable; ③ esta cetoamina puede continuar su ciclación dando GHB. ④ Reacciones posteriores generan los productos finales de la glucación avanzada (AGE) tales como ε-*N*-carboximetil-lisina y metilglioxal, compuestos que ⑤ pueden dañar otras proteínas al entrecruzarse con ellas, lo que da lugar a cambios patológicos.

Los disacáridos contienen un enlace glucosídico

Los disacáridos (tales como la maltosa, la lactosa y la sacarosa) están formados por dos monosacáridos unidos covalentemente mediante un **enlace *O*-glucosídico,** que se forma cuando un grupo hidroxilo de un azúcar reacciona con el carbono anomérico del otro **(Fig. 7–11)**. Esta reacción da lugar a la formación de un acetal a partir de un hemiacetal (tal como la glucopiranosa) y un alcohol (un grupo hidroxilo de una segunda molécula de azúcar) (Fig. 7–5). El compuesto resultante se denomina glucósido. Los enlaces glucosídicos se hidrolizan con facilidad por acción de ácidos pero son resistentes a la hidrólisis básica. Por lo tanto, los disacáridos pueden hidrolizarse para dar lugar a sus componentes monosacáridos por ebullición en un medio que contenga ácido diluido. Los enlaces *N*-glucosídicos unen el carbono anomérico de un azúcar y un átomo de nitrógeno en las glucoproteínas (véase la Fig. 7–31) y los nucleótidos (véase la Fig. 8–1).

La oxidación de un azúcar por iones cúpricos (la reacción que define a los azúcares reductores) tiene lugar solamente con la forma lineal, que está en equilibrio con la forma o formas cíclicas. Cuando el carbono anomérico participa en un enlace glucosídico, el residuo de azúcar que lo contiene no puede adoptar la forma lineal y, por tanto, se convierte en un azúcar no reductor. Al describir disacáridos o polisacáridos, el extremo de la cadena que contiene el carbono anomérico libre (es decir, aquel que no establece un enlace glucosídico) se suele conocer como **extremo reductor.**

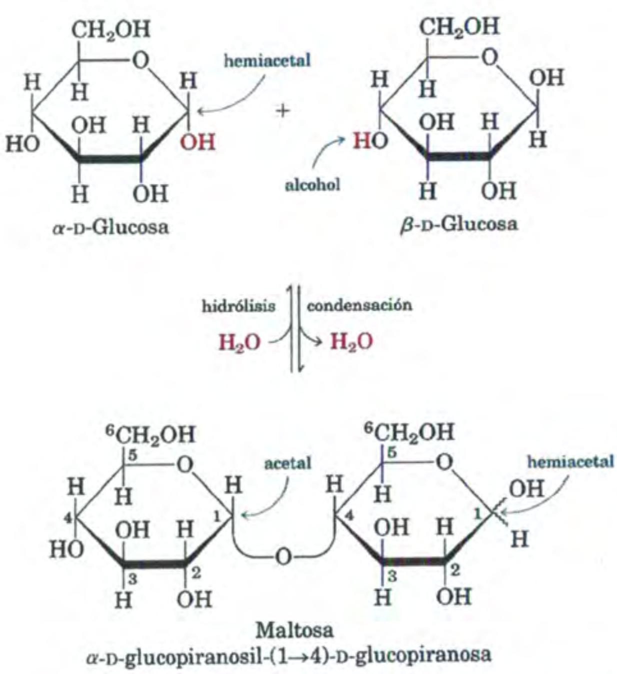


FIGURA 7–11 Formación de maltosa. Un disacárido se forma a partir de dos monosacáridos (en este caso, dos moléculas de D-glucosa) cuando un —OH (alcohol) de una molécula de glucosa (derecha) se condensa con el hemiacetal intramolecular de otra molécula (izquierda), con eliminación de H_2O y formación de un enlace glucosídico. La reacción inversa es la de hidrólisis (ataque del enlace glucosídico por parte de H_2O). La molécula de maltosa, mostrada aquí como ejemplo, retiene un hemiacetal reductor en el C-1 no implicado en el enlace glucosídico. Como la mutarrotación interconvierte las formas α y β del hemiacetal, a menudo los enlaces en esta posición se representan con líneas onduladas para indicar que la estructura puede ser tanto α como β.

El disacárido maltosa (Fig. 7–11) contiene dos residuos de D-glucosa unidos mediante un enlace glucosídico entre el C-1 (el carbono anomérico) de un residuo de glucosa y el C-4 de otro. La maltosa es un disacárido reductor porque mantiene un carbono anomérico libre (el C-1 del residuo de glucosa situado a la derecha en la Fig. 7–11). La configuración del átomo de carbono anomérico del enlace glucosídico es α. El residuo de glucosa con un carbono anomérico libre puede existir tanto en la forma piranosa α como en la β.

CONVENCIÓN CLAVE: Deben seguirse algunas reglas con el fin de poder denominar sin ambigüedades disacáridos tales como la maltosa y en especial otros oligosacáridos más complejos. Por convención, el nombre describe el compuesto escrito con su extremo no reductor a la izquierda mientras que el nombre "se construye" siguiendo el siguiente orden. (1) Se da la configuración (α o β) del átomo de carbono anomérico que une la primera unidad de monosacárido (izquierda) con la segunda. (2) Se nombra el residuo no reductor; para distinguir entre estructuras con anillos de cinco o seis miembros, se inserta el infijo "furan" o "piran" en el nombre. (3) Los dos átomos de carbono unidos por el enlace glucosídico se indican entre paréntesis, con una flecha que conecta los dos números; por ejemplo, (1→4) indica que el C-1 del primer residuo de azúcar se une al C-4 del segundo. (4) Se nombra el segundo residuo. Si existe un tercer residuo, se describe a continuación el segundo enlace glucosídico siguiendo las mismas convenciones. (Para hacer más corta la descripción de un polisacárido complejo se utilizan a menudo abreviaturas de tres letras o símbolos coloreados para cada monosacárido tal como se muestra en la Tabla 7-1.) Siguiendo esta convención para la nomenclatura de los oligosacáridos, la maltosa es la α-D-glucopiranosil-(1→4)-D-glucopiranosa. Puesto que la mayor parte de los azúcares que encontraremos en este libro son enantiómeros de la serie D y la forma piranosa es pre-

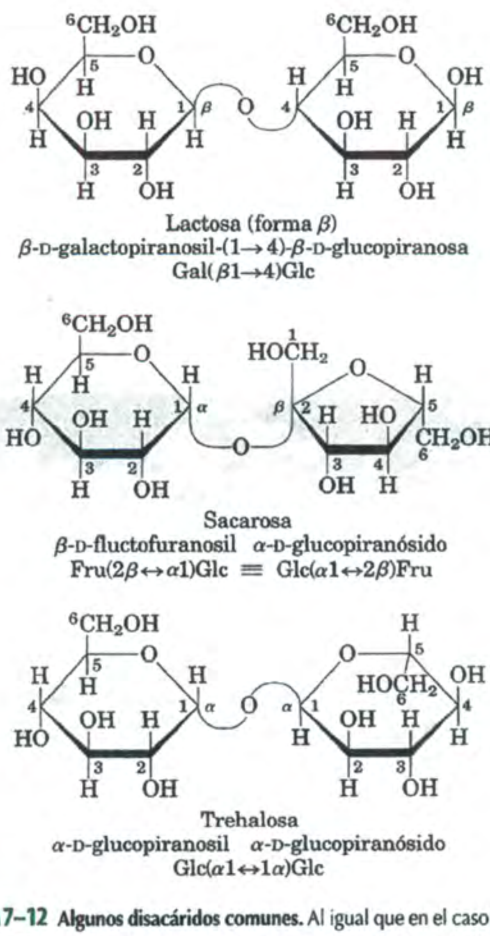
TABLA 7–1 Símbolos y abreviaturas de monosacáridos comunes y de sus derivados

Abecuosa	Abe	Ácido glucurónico	GlcA
Arabinosa	Ara	Galactosamina	GalN
Fructosa	Fru	Glucosamina	GlcN
Fucosa	Fuc	*N*-Acetilgalactosamina	GalNAc
Galactosa	Gal	*N*-Acetilglucosamina	GlcNAc
Glucosa	Glc	Ácido idurónico	IdoA
Manosa	Man	Ácido murámico	Mur
Ramnosa	Rha	Ácido *N*-acetilmurámico	Mur2Ac
Ribosa	Rib	Ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico)	Neu5Ac
Xilosa	Xyl		

Nota: En una convención utilizada frecuentemente, las hexosas se representan como círculos, las *N*-acetilhexosaminas como cuadrados y las hexosaminas como cuadrados divididos por una diagonal. Todos los azúcares con la configuración "gluco" son azules, los de la configuración "galacto" son amarillos y los azúcares "mano" son verdes. Se pueden añadir otros sustituyentes a medida que se necesiten: sulfato (S), fosfato (P), O-acetil (OAc) u O-metil (Ome).

dominante entre las hexosas, en general emplearemos una versión reducida del nombre formal de este tipo de compuestos, en la que se especifica la configuración del carbono anomérico y cuáles son los átomos de carbono unidos por el enlace glucosídico. En esta nomenclatura abreviada, la maltosa es Glc(α1→4)Glc. ■

El disacárido lactosa **(Fig. 7–12)**, que da lugar a D-galactosa y D-glucosa por hidrólisis, se encuentra en la leche. El carbono anomérico del residuo de glucosa puede ser oxidado y la lactosa es, por tanto, un disacárido reductor. Su nombre abreviado es Gal(β1→4)Glc. La sacarosa (azúcar de mesa) es un disacárido de glucosa y fructosa. Se sintetiza en plantas, pero no en animales. Al contrario que la maltosa y la lactosa, la sacarosa no contiene ningún carbono anomérico libre; los dos carbonos anoméricos se encuentran formando el enlace glucosídico (Fig. 7–12). Por tanto, la sacarosa es un azúcar no reductor. En la nomenclatura abreviada, una doble flecha conecta los símbolos que especifican los carbonos anoméricos y sus configuraciones. Por ejemplo, el nombre abreviado de la sacarosa es indistintamente Glc(α1↔2β)Fru o Fru(2β↔α1)Glc. La sacarosa en un producto intermedio principal de la fotosíntesis; en muchas plantas constituye la forma principal para el transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la planta. La trehalosa, Glc(α1↔1α)Glc (Fig. 7–12), es un disacárido de D-glucosa y, al igual que la sacarosa, es un azúcar no reductor. La trehalosa es un constituyente principal del fluído circulante (hemolinfa) de los insectos, con papel de reserva energética. Los hongos también contienen trehalosa y son utilizados como fuente comercial de este azúcar.



Lactosa (forma β)
β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosa
Gal(β1→4)Glc

Sacarosa
β-D-fluctofuranosil α-D-glucopiranósido
Fru(2β↔α1)Glc ≡ Glc(α1↔2β)Fru

Trehalosa
α-D-glucopiranosil α-D-glucopiranósido
Glc(α1↔1α)Glc

FIGURA 7–12 Algunos disacáridos comunes. Al igual que en el caso de la maltosa de la Figura 7-11, se representan en perspectivas de Haworth. Se muestran los nombres comunes, los nombres sistemáticos completos y sus abreviaturas para cada disacárido. La nomenclatura formal de la sacarosa nombra a la glucosa como glucósido original, aunque se dibuja típicamente en la forma mostrada en la que la glucosa se halla a la izquierda.

RESUMEN 7.1 Monosacáridos y disacáridos

- Los azúcares (también llamados sacáridos) son compuestos que contienen un grupo aldehído o cetona y dos o más grupos hidroxilo.
- Los monosacáridos generalmente contienen varios carbonos quirales y, por tanto, existen en diversas formas estereoquímicas, que se pueden representar sobre el papel según la proyección de Fischer. Los epímeros son azúcares que difieren en configuración en un solo átomo de carbono.
- Por lo general los monosacáridos forman hemiacetales y hemicetales internos en los que el grupo aldehído o cetona se une con un grupo hidroxilo de la misma molécula creando una estructura cíclica; esto se puede representar mediante una fórmula de perspectiva de Haworth. El átomo de carbono que se encontraba originariamente en el grupo aldehído o cetona (el carbono anomérico) puede adoptar una de las dos configuraciones, α y β, que son interconvertibles por mutarrotación. En la forma lineal, que está en equilibrio con las formas cicladas, el carbono anomérico se oxida fácilmente.
- Un grupo hidroxilo de un monosacárido puede reaccionar con el carbono anomérico de un segundo monosacárido formando un acetal. En este disacárido, el enlace glucosídico protege al carbono anomérico de la oxidación.
- Los oligosacáridos son polímeros cortos de varios monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. En un extremo de la cadena, el extremo reductor se encuentra una unidad monosacárida cuyo carbono anomérico no está formando un enlace glucosídico.
- La nomenclatura común para los di- y oligosacáridos especifica el orden de las unidades monosacáridas, la configuración en cada carbono anomérico y los átomos de carbono que forman el o los enlaces glucosídicos.

7.2 Polisacáridos

La mayoría de glúcidos naturales se encuentran en forma de polisacáridos, polímeros de medio a alto peso molecular. Los polisacáridos, denominados también **glucanos,** difieren entre sí en la naturaleza de sus unidades monoméricas repetitivas, en la longitud de sus cadenas, en los tipos de enlace que se forman entre las unidades y en su grado de ramificación. Los **homopolisacáridos** contienen un único tipo de monómero; los **heteropolisacáridos** contienen dos o más tipos diferentes **(Fig. 7–13)**. Algunos homopolisacáridos son formas de almacenamiento de monosacáridos que se usan como combustible biológico; el almidón y el glucógeno son homopolisacáridos de

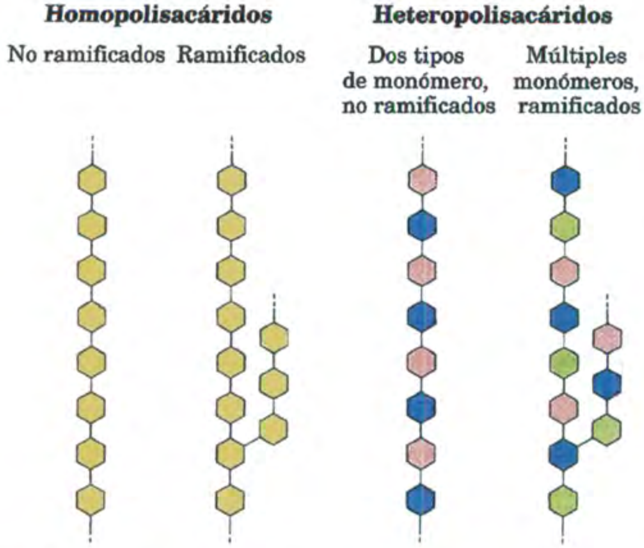


FIGURA 7–13 Homo- y heteropolisacáridos. Los polisacáridos pueden estar compuestos por uno, dos o varios monosacáridos diferentes y formar cadenas lineales o ramificadas de longitud diversa.

este tipo. Otros homopolisacáridos (como por ejemplo la celulosa y la quitina) actúan como elementos estructurales en las paredes celulares de plantas y en el exoesqueleto de algunos animales. Los heteropolisacáridos proporcionan soporte extracelular a organismos de todos los reinos. Por ejemplo, la capa rígida de la envoltura de la célula bacteriana (el peptidoglucano) está compuesta, en parte, por un heteropolisacárido formado por dos unidades alternantes de monosacáridos. En los tejidos animales, el espacio extracelular se encuentra ocupado por diversos tipos de heteropolisacáridos, que forman una matriz que mantiene unidas a las células individuales y proporciona protección, forma y soporte a células, tejidos y órganos.

A diferencia de las proteínas, los polisacáridos no suelen tener masas moleculares definidas. Ello se debe a los diferentes mecanismos de formación de los dos tipos de polímeros. Tal como se verá en el Capítulo 27, las proteínas se sintetizan a partir de un molde (RNA mensajero), de secuencia y longitud definidas, por acción de enzimas que copian el molde con fidelidad. No hay molde para la síntesis de polisacáridos; en lugar de ello, el programa para la síntesis de polisacáridos depende tan sólo de los enzimas que catalizan la polimerización de las unidades monoméricas, y no hay un punto específico para la finalización del proceso de síntesis.

Algunos homopolisacáridos son formas de almacenamiento de combustible

Los polisacáridos de reserva más importantes en la naturaleza son el almidón de las células vegetales y el glucógeno de las células animales. Ambos polisacáridos se encuentran en el interior de la célula formando agregados o gránulos de gran tamaño. Las moléculas de almidón y glucógeno están muy hidratadas porque tienen muchos grupos hidroxilo expuestos que pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua. La mayor parte de las células vegetales tienen capacidad para sintetizar almidón (véase la Fig. 20–2), pero el almacenamiento de este compuesto es especialmente abundante en tubérculos (tallos subterráneos), tales como la patata, y en semillas.

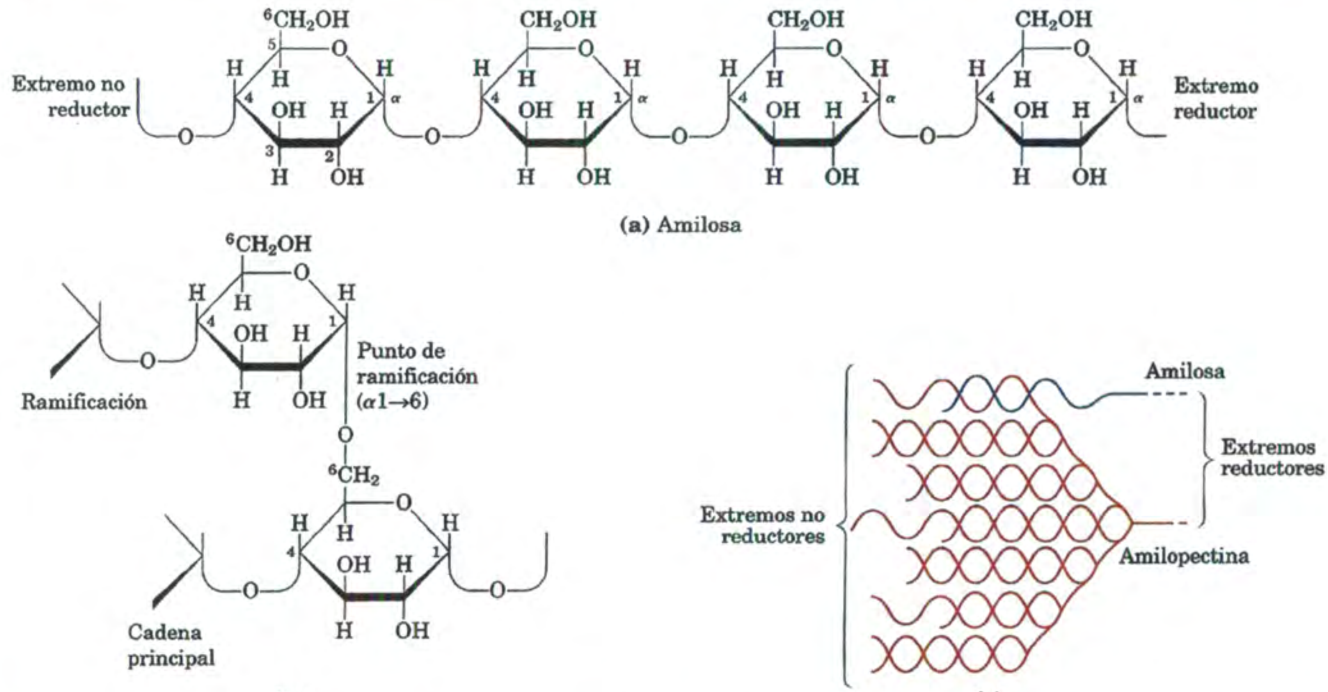


FIGURA 7–14 Glucógeno y almidón. (a) Pequeño fragmento de amilosa, un polímero lineal de residuos de D-glucosa unidos por enlaces (α1→4). Cada cadena de polímero contiene miles de residuos de D-glucosa. La amilopectina presenta segmentos de residuos unidos como la amilosa entre los puntos de ramificación. El glucógeno tiene la misma estructura básica pero está más ramificado que la amilopectina. (b) Un punto de ramificación (α1→6) del glucógeno o de la amilopectina. (c) Un acúmulo de amilosa y amilopectina similar al de los gránulos de almidón. Las cadenas de amilopectina (en rojo) forman una estructura de doble hélice entre sí o con cadenas de amilosa (en azul). Los residuos de glucosa en los extremos no reductores de las ramificaciones externas se eliminan enzimáticamente durante la movilización intracelular del almidón para producir energía. El glucógeno, similar, es más ramificado y compacto.

El **almidón** contiene dos tipos de polímero de glucosa, la amilosa y la amilopectina (**Fig. 7–14**). El primero consiste en cadenas largas y sin ramificar de residuos de D-glucosa conectadas por enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 4$) (al igual que en la maltosa). Estas cadenas oscilan entre una masa molecular de unos pocos miles a más de un millón. La amilopectina también posee una elevada masa molecular (hasta 200 millones), pero, a diferencia de la amilosa, está altamente ramificada. Los enlaces glucosídicos que unen residuos sucesivos de glucosa en las cadenas de amilopectina son del tipo ($\alpha 1 \rightarrow 4$); los puntos de ramificación (presentes cada 24 a 30 residuos) son enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 6$).

El **glucógeno** es el polisacárido de reserva más importante en las células animales. Al igual que la amilopectina, el glucógeno es un polímero con subunidades de glucosa unidas por enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 4$) y con ramificaciones del tipo ($\alpha 1 \rightarrow 6$), pero el glucógeno está más ramificado (de media, cada 8 a 12 residuos) y es más compacto que el almidón. El glucógeno es especialmente abundante en el hígado, donde puede llegar a representar el 7% de su peso; también se encuentra en el músculo esquelético. En los hepatocitos el glucógeno está en forma de gránulos de gran tamaño que son, a su vez, agrupaciones de gránulos más pequeños, compuestos por moléculas individuales de glucógeno altamente ramificadas con una masa molecular de varios millones. Los gránulos de glucógeno también contienen, íntimamente unidos, los enzimas responsables de su síntesis y degradación.

Puesto que cada rama de glucógeno termina con un azúcar no reductor, una molécula de glucógeno con n ramas tiene $n+1$ extremos no reductores, pero únicamente un extremo reductor. Cuando el glucógeno se emplea como fuente de energía, las unidades de glucosa son eliminadas de una en una de los extremos no reductores. Los enzimas degradativos que actúan solamente sobre los extremos no reductores pueden actuar simultáneamente en muchas ramas, aumentando la velocidad de conversión del polímero en monosacáridos.

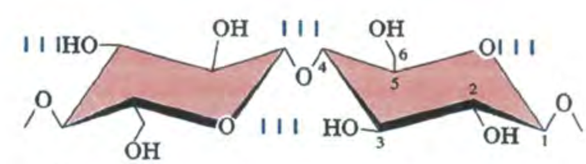
¿Por qué razón la glucosa no se almacena en forma monomérica? Se ha calculado que el glucógeno almacenado en los hepatocitos equivale a una concentración de glucosa de 0,4 M. En cambio, la concentración de glucógeno, que es insoluble y contribuye poco a la osmolaridad del citosol, es de aproximadamente 0,01 μM. Si el citosol contuviera una disolución de glucosa 0,4 M, la osmolaridad de la célula sería peligrosamente elevada, lo que provocaría la entrada osmótica de agua que podría ocasionar la ruptura de la célula (véase la Fig. 2-12). Además, con una concentración intracelular de glucosa de 0,4 M y una concentración externa de aproximadamente 5 mM (concentración en la sangre de los mamíferos), la variación de energía libre para la captación celular de glucosa contra este altísimo gradiente de concentración sería excesivamente elevada.

Los **dextranos** son polisacáridos de poli-D-glucosa unida por enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 6$), presentes en bacterias y levaduras; todos tienen ramificaciones ($\alpha 1 \rightarrow 3$) y algunos también ($\alpha 1 \rightarrow 2$) o ($\alpha 1 \rightarrow 4$). La placa dental, producida por las bacterias que crecen en la superficie de los dientes, es rica en dextranos. Los dextranos sintéticos se usan en diversos productos comerciales (por ejemplo, el Sephadex) utilizados en el fraccionamiento de proteínas por cromatografía de exclusión molecular (véase la Fig. 3–17b). En estos productos los dextranos están entrecruzados para formar materiales insolubles de diferente porosidad, que dejan pasar macromoléculas de diferentes tamaños.

Algunos homopolisacáridos tienen función estructural

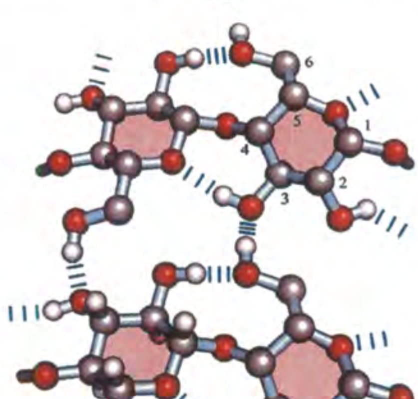
La celulosa, una sustancia fibrosa, resistente e insoluble en agua, se encuentra en las paredes celulares de plantas, en particular en cañas, tallos, troncos y en todos los tejidos vegetales leñosos. La celulosa constituye una gran parte de la masa de la madera, y el algodón es celulosa casi pura. Al igual que la amilosa la celulosa es una molécula lineal no ramificada formada por unas 10.000 a 15.000 unidades de D-glucosa. Pero hay una diferencia muy importante: los residuos de glucosa de la celulosa tienen configuración β (**Fig. 7–15**), mientras que en la amilosa la glucosa se encuentra en configuración α Los residuos de glucosa de la celulosa están unidos por enlaces glucosídicos ($\beta 1 \rightarrow 4$), a diferencia de los enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 4$) de la amilosa. Esta diferencia hace que la estructura y las propiedades físicas de la celulosa y la amilosa sean muy diferentes.

El glucógeno y el almidón que se ingieren con la dieta son hidrolizados por α-amilasas y glucosidasas, enzimas contenidos en la saliva y en el intestino que rompen enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 4$) entre unidades de glucosa. La mayoría de animales no pueden utilizar la celulosa como fuente de energía, porque carecen de un enzima capaz de hidrolizar los enlaces ($\beta 1 \rightarrow 4$). Las termitas pueden digerir fácilmente la celulosa (y, por tanto, la madera), pero ello sólo gracias a que en su tracto intestinal se aloja un microorganismo simbiótico, *Trichonympha*, que se-



Unidades de D-glucosa unidas por enlaces ($\beta 1 \rightarrow 4$)

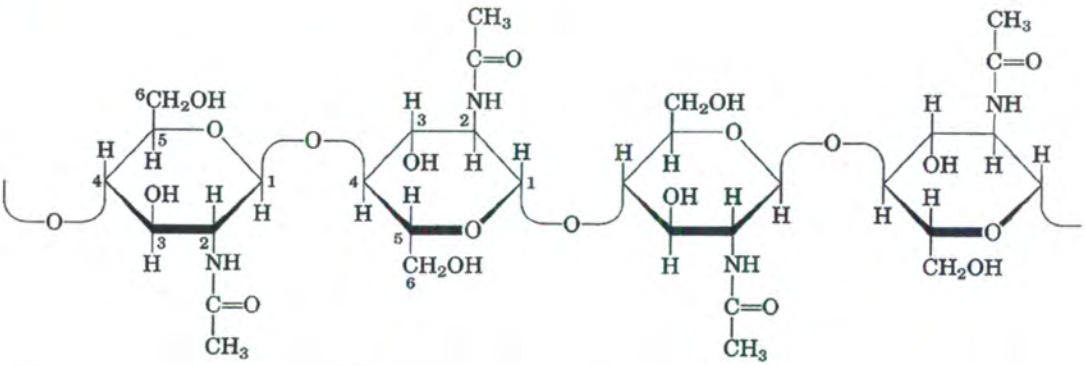
(a)



(b)

FIGURA 7–15 Estructura de la celulosa. **(a)** Dos unidades de una cadena de celulosa; los residuos de D-glucosa están unidos por enlaces ($\beta 1 \rightarrow 4$). Las estructuras de silla rígida pueden presentar movimiento de rotación entre ellas. **(b)** Dibujo a escala de segmentos de dos cadenas paralelas de celulosa, donde se muestra la conformación de los residuos de D-glucosa y los enlaces de hidrógeno entrelazantes. En la unidad de hexosa de la parte inferior izquierda se muestran todos los átomos de hidrógeno; en las otras tres unidades de hexosa se han omitido los hidrógenos unidos a átomos de carbono para mayor claridad en la representación, puesto que no participan en enlaces de hidrógeno.

FIGURA 7–16 Degradación de la celulosa por los hongos de la madera. Un hongo de la madera creciendo en un tocón de roble. Todos los hongos de la madera tienen el enzima celulasa, que rompe los enlaces glucosídicos (β1→4) de la celulosa y hace posible el uso de la madera como fuente de azúcar metabolizable (glucosa) por los hongos. Los únicos vertebrados capaces de utilizar la celulosa como nutriente son el ganado vacuno y otros rumiantes (ovejas, cabras, camellos, jirafas). El compartimiento estomacal adicional (rumen) de un rumiante aloja bacterias y protistas que secretan celulasa.



(a)

(b)

FIGURA 7–17 Quitina. (a) Segmento corto de quitina, un homopolímero de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina con enlaces (β1→4). (b) Un coleóptero (*Pelidnota punctata*) con su exosqueleto de quitina.

creta celulasa, la cual hidroliza los enlaces (β1→4). Los hongos que crecen en la madera en putrefacción y las bacterias también producen celulasa **(Fig. 7–16)**.

La **quitina** es un homopolisacárido lineal compuesto por residuos de *N*-acetilglucosamina unidos por enlaces (β1→4) **(Fig. 7–17)**. La única diferencia química con respecto a la celulosa es el cambio del grupo hidroxilo en C-2 por un grupo amino acetilado. La quitina forma fibras extendidas similares a las de la celulosa y, al igual que ésta, no es digerible por los vertebrados. La quitina es el componente principal de los duros exoesqueletos del aproximadamente un millón de especies de artrópodos (insectos, langostas y cangrejos, por ejemplo) y es, probablemente, el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa; se calcula que cada año se producen en la biosfera alrededor de ¡mil millones de toneladas de quitina!

Los factores estéricos y los puentes de hidrógeno contribuyen al plegamiento de los homopolisacáridos

El plegamiento de los polisacáridos en tres dimensiones responde a los mismos principios que gobiernan la estructura de los polipéptidos: subunidades con estructura más o menos rígida dictada por enlaces covalentes forman estructuras macromoleculares tridimensionales estabilizadas por interacciones débiles intra o intermoleculares: puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y de van der Waals y, en polímeros con subunidades cargadas, interacciones electrostáticas. Al tener los polisacáridos tantos grupos hidroxilo, los puentes de hidrógeno tienen una especial importancia en su estructura. El glucógeno, el almidón y la celulosa están formados de subunidades de piranosa (con anillos de seis átomos) lo mismo que los oligosacáridos de las glucoproteínas y los glucolípidos que se estudiarán más adelante. Tales moléculas pueden representarse como una serie de anillos rígidos de piranosa conectados por un átomo de oxígeno que une dos átomos de carbono (el enlace glucosídico). En principio, hay libertad de rotación en torno a los enlaces C–O que unen los residuos (Fig. 7–15a), pero al igual que en los polipéptidos (véanse las Figs. 4–2 y 4–8), la rotación alrededor de cada enlace está limitada por los impedimentos estéricos de los sustituyentes. La

estructura tridimensional de estas moléculas puede ser descrita en términos de los ángulos diedros, ϕ y Ψ, del enlace glucosídico **(Fig. 7–18)**, análogos a los ángulos ϕ y Ψ del enlace peptídico (véase la Fig. 4–2).

El volumen del anillo de piranosa y de sus sustituyentes, así como los efectos electrónicos del carbono anomérico, imponen restricciones a los ángulos ϕ y Ψ; así, algunas conformaciones son mucho más estables que otras, tal como puede verse en un mapa de energía en función de ϕ y Ψ **(Fig. 7–19)**.

La estructura tridimensional más estable de las cadenas unidas por enlaces (α1→4) del almidón y el glucógeno es una espiral compacta **(Fig. 7–20)**, estabilizada por puentes de hidrógeno intercatenarios. En la amilosa (sin ramificar) esta estructura es suficientemente regular para hacer posible su cristalización y, por lo tanto, la determinación de su estructura por difracción de rayos X. A lo largo de la cadena de amilosa, el plano promedio de cada residuo forma un ángulo de 60° con el plano promedio del residuo precedente, de manera que la hélice tiene seis residuos por vuelta. En la amilosa el orificio de la hélice tiene las dimensiones justas para acomodar yodo en forma de complejo con iones I_3^- o I_5^- dando lugar a un complejo de color azul intenso. Esta interacción constituye el fundamento de una determinación cualitativa habitual de la amilosa.

La conformación más estable de la celulosa es aquella en que cada silla experimenta una rotación de 180° en relación con sus vecinas, lo cual genera una cadena extendida recta. Todos los grupos —OH están disponibles para formar puentes de hidrógeno con cadenas vecinas. Una red estable de puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares entre varias cadenas dispuestas paralelamente produce fibras supramoleculares estables con gran resistencia a la tracción (Fig. 7–15b). Esta propiedad de la celulosa la ha hecho socialmente útil durante milenios. Muchos productos manufacturados entre los que se cuentan el papiro, papel, cartón, rayón, paneles aislantes y muchos otros materiales de utilidad son derivados de la celulosa. El contenido en agua de estos materiales es bajo porque la gran abundancia de puentes de hidrógeno intermoleculares satisface su capacidad de formación de puentes de hidrógeno.

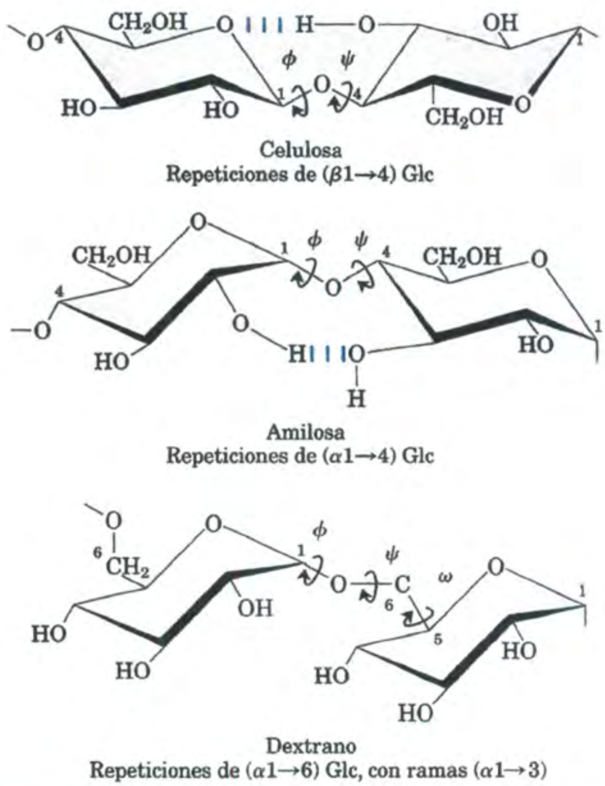


FIGURA 7–18 Conformación de los enlaces glucosídicos de la celulosa, la amilosa y el dextrano. Los polímeros se representan como anillos rígidos de piranosa unidos por enlaces glucosídicos con rotación libre en torno a estos enlaces. Obsérvese que en el dextrano también hay rotación libre en torno del enlace entre C-5 y C-6 (ángulo de torsión ω).

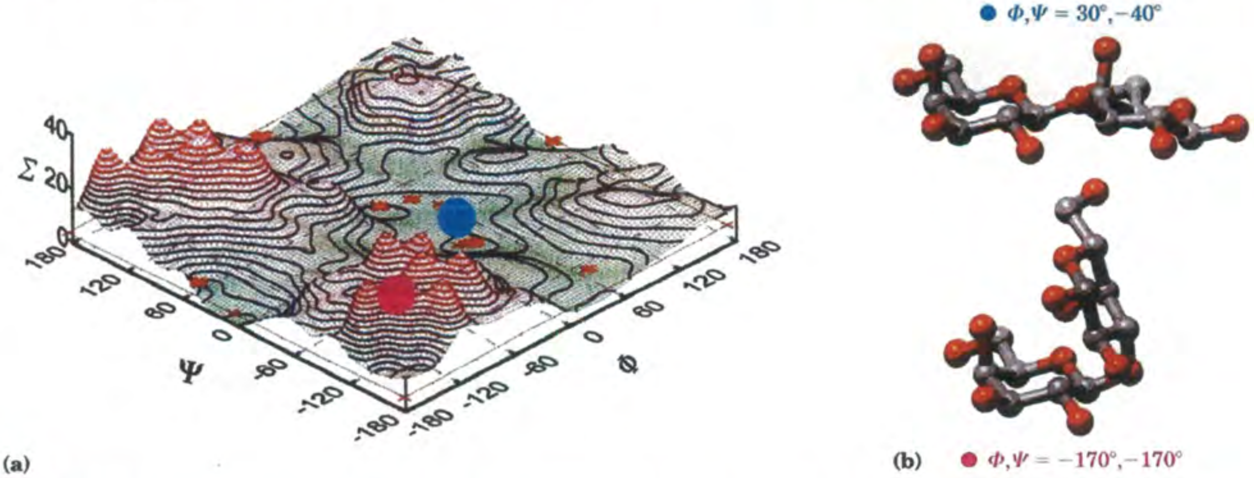


FIGURA 7–19 Mapa de las conformaciones más favorables de oligosacáridos y polisacáridos. Los ángulos de torsión Ψ y ϕ (véase la Fig. 7–18) que definen la relación espacial entre anillos adyacentes pueden en principio tener cualquier valor entre 0° y 360°. De hecho, algunos ángulos de torsión dan lugar a conformaciones estéricamente prohibidas, mientras que otras dan conformaciones que maximizan los puentes de hidrógeno. **(a)** Cuando se representa la energía relativa (Σ) para cada valor de ϕ y Ψ, con los contornos de isoenergía ("misma energía") dibujados a intervalos de 1 kcal/mol por encima del estado de mínima energía, se obtiene un mapa de las conformaciones más favorables, análogo a la representación de Ramachandran para péptidos (véanse las Figs. 4–3 y 4–8). **(b)** Dos conformaciones energéticamente extremas para el disacárido Gal(β1→3)Gal caen en el diagrama de energía **(a)** según indican los puntos rojos y azules. Los puntos rojos indican la conformación menos favorecida y la azul la más favorecida. Las conformaciones conocidas de los tres polisacáridos mostrados en la Figura 7–18 se han determinado por cristalografía de rayos X, y se encuentran dentro de las regiones de menor energía del mapa.

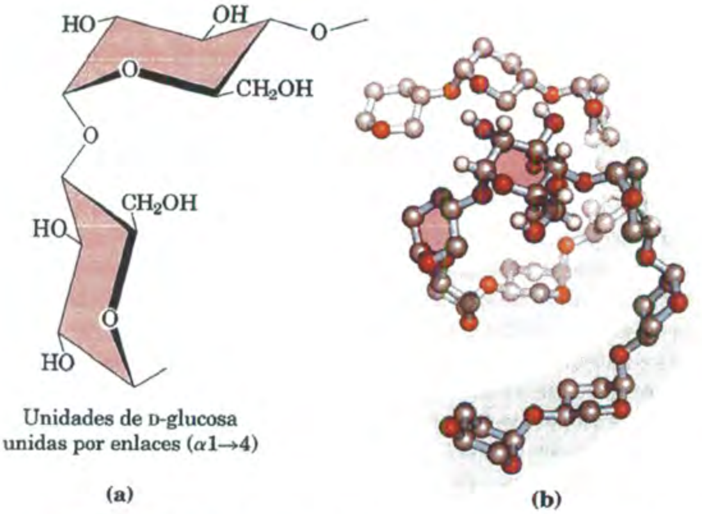


FIGURA 7–20 Almidón (amilosa). (a) En su conformación más estable de sillas rígidas adyacentes, la cadena de polisacárido se encuentra curvada en lugar de encontrarse estirada como en la celulosa (véase la Fig. 7–15). **(b)** Modelo de un segmento de amilasa; a fin de mayor claridad, se han omitido los grupos hidroxilo de todos excepto uno de los residuos de glucosa. Compare los dos residuos sombreados en rosa con las estrucuras químicas de **(a)**. La conformación de los enlaces (α1→4) de la amilosa, la amilopectina y el glucógeno hacen que estos polímeros adopten una estructura helicoidal compacta. Esta estructura compacta es la responsable de la densidad de los gránulos de almidón o glucógeno almacenados, visibles en muchas células (véase la Fig. 20–2).

Las paredes celulares de algas y bacterias contienen heteropolisacáridos estructurales

El componente rígido de las paredes bacterianas (peptidoglucano) es un heteropolímero de unidades de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico alternadas unidas por enlaces (β1→4) (véase la Fig. 20–31). En la pared celular las cadenas lineales están dispuestas paralelamente unas a otras y entrecruzadas mediante péptidos cortos, cuya estructura concreta depende de la especie bacteriana. Los entrecruzamientos peptídicos sueldan entre sí las cadenas de polisacárido y forman una envoltura resistente que rodea toda la célula, evitando que ésta se hinche y se lise a causa de la entrada de agua por ósmosis. El enzima lisozima destruye las bacterias mediante la hidrólisis del enlace glucosídico (β1→4) entre la *N*-acetilglucosamina y el ácido *N*-acetilmurámico (véase la Fig. 6–24). La lisozima se encuentra en las lágrimas del ojo, donde posiblemente actúa como protector frente a infecciones bacterianas. También es producida por ciertos virus bacterianos, con el fin de garantizar su liberación desde la bacteria huésped, paso esencial del ciclo de la infección vírica. La penicilina y otros antibióticos relacionados destruyen las bacterias impidiendo la síntesis de los entrecruzamientos, lo que deja la pared celular demasiado débil para resistir la lisis osmótica (véanse las pp. 216–217).

Algunas algas rojas marinas tienen paredes celulares que contienen **agar,** una mezcla de heteropolisacáridos sulfatados, formados por D-galactosa y un derivado de L-galactosa con un enlace éter entre el C-3 y el C-6. El agar es una mezcla compleja de polisacáridos, todos con la misma estructura troncal pero con diferentes grados de sustitución por sulfatos y piruvato. La **agarosa** (M_r ~150.000) es el componente del agar con menos grupos cargados (sulfatos, piruvatos) **(Fig. 7–21)**. La notable

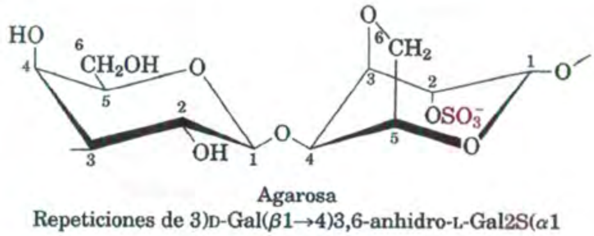


FIGURA 7–21 Estructura de la agarosa. La unidad repetitiva consiste en D-galactosa (β1→4) unida a 3,6-anhidro-L-galactosa (en la cual el anillo éter conecta C-3 y C-6). Estas unidades están unidas por enlaces glucosídicos (α1→3) para formar un polímero de 600 a 700 residuos de longitud. Una pequeña fracción de los residuos de 3,6-anhidrogalactosa tienen un éster sulfato en C-2 (éste es el caso aquí representado).

capacidad de la agarosa para formar geles es aprovechada en los laboratorios de bioquímica. Cuando se calienta una suspensión de agarosa en agua y a continuación se enfría, la agarosa forma una doble hélice: dos moléculas en orientación paralela se enrollan una en torno de la otra con una periodicidad helicoidal de tres residuos; la cavidad central retiene moléculas de agua. A su vez, estas estructuras se asocian entre sí para formar un gel, una matriz tridimensional que retiene grandes cantidades de agua. Los geles de agarosa se usan como soporte inerte para la separación electroforética de ácidos nucleicos, un paso esencial en el proceso de secuenciación del DNA (p. 292). El agar también se usa para formar una superficie adecuada para el crecimiento de colonias bacterianas. Otro uso comercial del agar es la fabricación de cápsulas que contienen vitaminas u otros fármacos; el material de agar seco se disuelve fácilmente en el estómago y es metabólicamente inerte.

Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos de la matriz extracelular

El espacio extracelular de los tejidos de animales multicelulares está ocupado por un material gelatinoso, la **matriz extracelular (ECM),** también denominada sustancia basal, que mantiene unidas las células y forma un medio poroso para la difusión de nutrientes y oxígeno hacia las células individuales. La matriz extracelular que rodea los fibroblastos y otras células del tejido conjuntivo está compuesta por una compleja red de moléculas de heteropolisacáridos interconectadas y proteínas fibrosas tales como los colágenos fibrilares, la elastina y la fibronectina. Estos heteropolisacáridos, los **glucosaminoglucanos,** son una familia de polímeros lineales compuestos por unidades repetitivas de disacárido **(Fig. 7–22)**. Se encuentran únicamente en animales y bacterias y no se encuentran en los vegetales. Uno de los dos monosacáridos es siempre la *N*-acetilglucosamina o bien la *N*-acetilgalactosamina; el otro es, en la mayor parte de casos, un ácido urónico, generalmente el ácido D-glucurónico o el L-idurónico. Algunos glucosaminoglucanos contienen grupos sulfato esterificados. La combinación de éstos y los grupos carboxilato de los residuos de ácido urónico hace que los glucosaminoglucanos tengan una elevada densidad de carga negativa. Para minimizar las fuerzas repulsivas entre los grupos cargados próximos entre sí, estas moléculas adoptan una conformación extendida en disolución formando una hélice en forma de varilla en la que los grupos carboxilato negativos se encuentran en

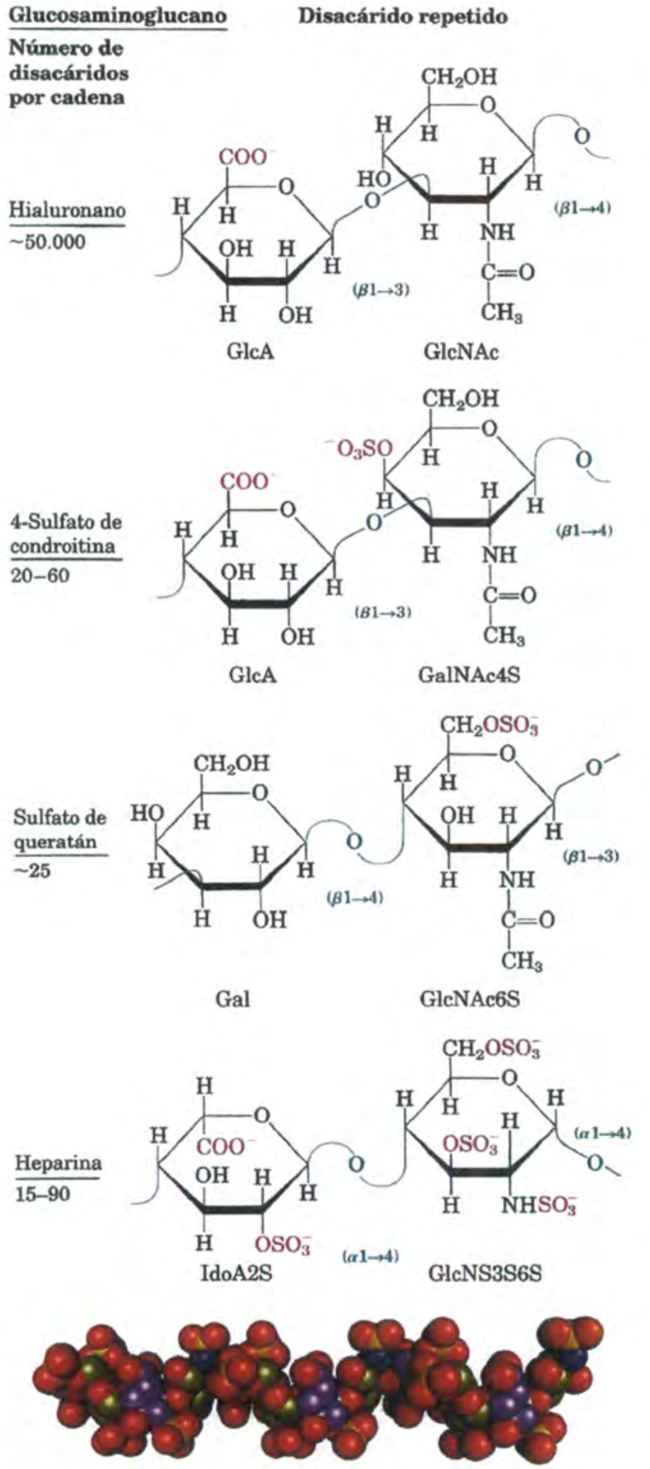
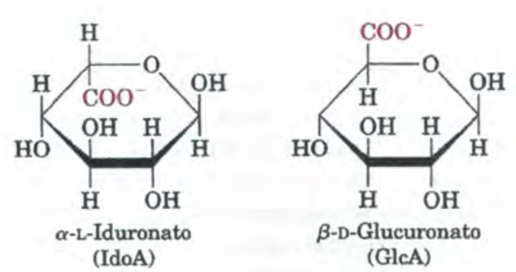


FIGURA 7–22 Unidades repetidas de algunos glucosaminoglucanos comunes de la matriz extracelular. Las moléculas son copolímeros formados por residuos alternados de ácido urónico y aminoazúcares (el sulfato de queratán constituye una excepción), con ésteres sulfato situados en diversas posiciones, excepto el hialuronano. Los grupos carboxilato y sulfato ionizados (en rojo en las fórmulas en perspectiva) confieren a estos polímeros su característica elevada carga negativa. La heparina terapéutica contiene principalmente ácido idurónico (IdoA) y una menor proporción de ácido glucurónico (GlcA, no mostrado), se encuentra generalmente muy sulfatada y es de longitud variable. El modelo espacial muestra un segmento de heparina en su estructura en solución determinada por espectroscopia RMN (PDB ID 1HPN). Los carbonos del ácido idurónico sulfatado son azules; los de la glucosamina sulfato, verdes. Los átomos de oxígeno y de azufre se muestran en sus colores estándar rojo y amarillo, respectivamente. No se muestran, para mayor claridad, los átomos de hidrógeno. El sulfato de heparán (no mostrado) es similar a la heparina, pero posee una proporción mayor de GlcA y menos grupos sulfato, dispuestos de forma menos regular.

lados alternos de la hélice (tal como se muestra para la heparina en la Fig. 7–22). La forma de varilla extendida también proporciona una separación máxima entre los grupos sulfato cargados negativamente. Los patrones específicos de los residuos de azúcares sulfatados y no sulfatados en los glucosaminoglucanos hacen posible el reconocimiento específico por una amplia variedad de ligandos proteicos que se unen electrostáticamente a estas moléculas. Los glucosaminoglucanos sulfatados se unen a proteínas extracelulares para formar proteoglucanos (Sección 7.3).

El glucosaminoglucano **hialuronano** (ácido hialurónico) contiene unidades alternadas de ácido D-glucurónico y *N*-acetilglucosamina (Fig. 7–22). Con hasta 50.000 repeticiones de la unidad disacárida básica, el hialuronano tiene una masa molecular de varios millones; forma disoluciones transparentes y muy viscosas que sirven de lubricante en el líquido sinovial de las articulaciones y confieren consistencia gelatinosa al humor vítreo del ojo de los vertebrados (en griego, *hyalos* significa "vidrio"; el hialuronano puede tener un aspecto vítreo o translúcido). El hialuronano es también un componente esencial de la matriz extracelular de cartílagos y tendones, a los que dota de resistencia a la tensión y elasticidad, resultado de sus fuertes interacciones con otros componentes de la matriz. La hialuronidasa, un enzima secretado por algunas bacterias patógenas, puede hidrolizar los enlaces glucosídicos del hialuronano, haciendo que los tejidos sean más susceptibles a las invasiones bacterianas. En muchas epecies un enzima similar presente en el esperma hidroliza la capa externa de glucosaminoglucano que protege el óvulo, lo que permite la penetración de los espermatozoides.

Otros glucosaminoglucanos se diferencian del hialuronano en tres aspectos: generalmente son polímeros mucho más cortos, están unidos covalentemente a proteínas específicas (proteoglucanos) y una o las dos unidades monoméricas son diferentes de las del hialuronano. El **sulfato de condroitina** (en griego *chondros* significa "cartílago") contribuye a la resistencia a la tensión de los cartílagos, tendones, ligamentos y paredes de la aorta. El sulfato de dermatán (en griego *derma* significa "piel") contribuye a la flexibilidad de la piel y también está presente en los vasos sanguíneos y en las válvulas cardíacas. En este polímero, muchos de los residuos de glucuronato presentes en el sulfato de condroitina están reemplazados por por su epímero en 5, el L-iduronato.



α-L-Iduronato (IdoA) β-D-Glucuronato (GlcA)

Los sulfatos de queratán (en griego *keras* significa "cuerno") no tienen ácido urónico y su contenido en sulfato es variable. Están presentes en la córnea, los cartílagos, los huesos y en diversas estructuras córneas formadas por células muertas: cuernos, pelos, pezuñas, uñas y garras. El sulfato de heparán (en griego *hepar* significa "hígado") es producido por todas las células animales y contiene ordenamientos variables de azúcares sulfatados y no sulfatados. Los segmentos sulfatados de la cadena permiten la interacción con un gran número de proteínas, entre las que se incluyen factores de crecimiento y componentes de la ECM, así como diversos enzimas y factores presentes en el plasma. La heparina es una forma fraccionada del **sulfato de heparán** producido en los mastocitos (un tipo de leucocito). La heparina es un agente terapéutico utilizado para inhibir la coagulación gracias a su capacidad para unirse al inhibidor de proteasas antitrombina. La unión de la heparina hace que la antitrombina se una e inhiba a la trombina, una proteasa esencial para la coagulación de la sangre. La interacción es muy electrostática; la heparina tiene la densidad de carga negativa más elevada entre todas las macromoléculas biológicas conocidas **(Fig. 7-23)**. La heparina purificada se añade rutinariamente a las muestras de sangre para análisis clínicos y a la sangre donada para transfusiones con objeto de prevenir la coagulación.

La Tabla 7–2 resume la composición, propiedades, funciones y localización de los polisacáridos descritos en la sección 7.2.

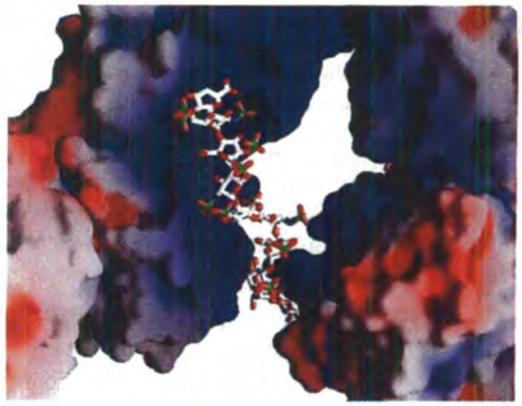


FIGURA 7–23 Interacción entre un glucosaminoglucano y su proteína de unión. El factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF1), su receptor de superficie celular (FGFR) y un corto segmento de glucosaminoglucano (heparina) fueron cocristalizados para dar la estructura que aquí se muestra (PDB ID 1E0O). Las proteínas se representan según contornos superficiales en los que el color representa el potencial electrostático de superficie: rojo, carga predominantemente negativa; azul, carga predominantemente positiva. La heparina se muestra con la modalidad de bolas y segmentos con las cargas negativas ($—SO_3^-$ y $—COO^-$) unidas a la superficie positiva (azul) de la proteína FGF1. En este experimento se utilizó heparina, pero in vivo el glucosaminoglucano que se une al FGF en la superficie celular es el sulfato de heparán.

TABLA 7–2 Estructura y función de algunos polisacáridos

Polímero	Tipo*	Unidad repetitiva†	Tamaño (número de unidades de monosacárido)	Funciones/significado
Almidón				Reserva energética: en plantas
Amilosa	Homo-	(α1→4)Glc, lineal	50–5.000	
Amilopectina	Homo-	(α1→4)Glc, con ramificaciones (α1→6)Glc cada 24–30 residuos	Hasta 10^6	
Glucógeno	Homo-	(α1→4)Glc, con ramificaciones (α1→6)Glc cada 8–12 residuos	Hasta 50.000	Reserva energética: en bacterias y células animales
Celulosa	Homo-	(β1→4)Glc	Hasta 15.000	Estructural: confiere rigidez y resistencia a las paredes de células vegetales
Quitina	Homo-	(β1→4)GlcNAc	Muy grande	Estructural: confiere rigidez y resistencia a los exoesqueletos de insectos, arañas y crustáceos
Dextrano	Homo-	(α1→6)Glc, con ramific. (α1→3)	Muy grande	Estructural: adhesivo extracelular en bacterias
Peptidoglucano	Hetero-; péptidos unidos	4)Mur2Ac(β1→4) GlcNAc(β1	Muy grande	Estructural: confiere rigidez y resistencia a la envoltura celular bacteriana
Agarosa	Hetero-	3)D-Gal(β1→4)3,6-anhidro-L-Gal(α1	1.000	Estructural: componente de la pared celular de las algas
Hialuronano (un glucosamino-glucano)	Hetero-; acídico	4)GlcA(β1→3) GlcNAc(β1	Hasta 100.000	Estructural: en vertebrados forma parte de la matriz extracelular de la piel y tejido conjuntivo; viscosidad y lubricación en articulaciones

*Cada polímero se clasifica como homopolisacárido (homo-) o heteropolisacárido (hetero-).

†Las abreviaturas utilizadas para las unidades repetitivas de peptidoglucano, agarosa e hialuronano indican que el polímero contiene repeticiones de esta unidad de disacárido. Por ejemplo, en el peptidoglucano, la GlcNAc de un disacárido está unida por un enlace (β1→4) al primer residuo de la siguiente unidad de disacárido.

RESUMEN 7.2 Polisacáridos

- Los polisacáridos (glucanos) sirven de reserva energética y de componentes estructurales en las paredes celulares y en la matriz extracelular.
- Los homopolisacáridos almidón y glucógeno son combustibles de reserva en las células vegetales, animales y bacterianas. Consisten en D-glucosa con enlaces (α1→4) y los dos están ramificados.
- Los homopolisacáridos celulosa, quitina y dextrano tienen papeles estructurales. La celulosa está formada por residuos de D-glucosa unidos por enlaces (β1→4) y confiere resistencia y rigidez a las paredes celulares de las plantas. La quitina, un polímero de *N*-acetilglucosamina unida por enlaces (β1→4), confiere resistencia a los exoesqueletos de los artrópodos. El dextrano forma una envoltura adhesiva en el exterior de algunas bacterias.
- Los homopolisacáridos se pliegan en tres dimensiones. La forma de silla del anillo de la piranosa es esencialmente rígida, por lo que la conformación de los polímeros está determinada por la rotación en torno a los enlaces entre el anillo y el átomo de oxígeno en el enlace glucosídico. El almidón y el glucógeno forman estructuras helicoidales con puentes de hidrógeno intracatenarios; la celulosa y la quitina forman cadenas largas y estiradas que interaccionan con cadenas vecinas.
- Las paredes celulares de las bacterias y las algas están reforzadas por heteropolisacáridos (peptidoglucano en las bacterias, agar en las algas rojas). El disacárido repetido en los peptidoglucanos es GlcNAc(β1→4)Mur2Ac; en la agarosa es D-Gal(β1→4)3,6-anhidro-L-Gal.
- Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos extracelulares en los que una de las dos unidades de monosacárido es un ácido urónico (el sulfato de queratán es una excepción) y la otra un aminoazúcar *N*-acetilado. Los ésteres sulfato de algunos de los grupos hidroxilo y de grupos amino de algunos residuos de glucosamina en la heparina y en el sulfato de heparán confieren a estos polímeros una elevada densidad de carga negativa, que fuerza la adopción de estructuras extendidas. Estos polímeros (hialuronano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán y sulfato de queratán) son responsables de la viscosidad, adhesividad y resistencia a la tensión de la matriz extracelular.

7.3 Glucoconjugados: proteoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos

Además de sus importantes funciones como combustibles de reserva (almidón, glucógeno, dextrano) y como materiales estructurales (celulosa, quitina, peptidoglucanos), los polisacáridos y los oligosacáridos son transportadores de información. Algunos proporcionan comunicación entre células y su entorno extracelular; otros etiquetan proteínas para su transporte y localización en orgánulos específicos o para su destrucción cuando la proteína está malformada o se vuelve superflua; otros, finalmente, actúan como sitios de reconocimiento de moléculas de señalización extracelulares (factores de crecimiento, por ejemplo) o parásitos extracelulares (bacterias o virus). En casi todas las células eucarióticas, cadenas de oligosacáridos específicos unidas a los componentes de la membrana plasmática forman una capa glucídica (el glucocálix) de varios nanómetros de espesor que constituye una superficie rica en información que la célula expone a su entorno. Estos polisacáridos juegan un papel central en el reconocimiento y la adhesión célula–célula, en la migración celular durante el desarrollo, en la coagulación sanguínea, en la respuesta inmunitaria, en la cicatrización de las heridas y en otros procesos celulares. En la mayor parte de estos casos, el glúcido portador de la información está unido covalentemente a una proteína o a un lípido para formar un **glucoconjugado,** que es la molécula biológicamente activa.

Los **proteoglucanos** son macromoléculas de la superficie celular o de la matriz extracelular en las que una o más cadenas de glucosaminoglucano están unidas covalentemente a una proteína de membrana o a una proteína de secreción. La cadena de glucosaminoglucano puede unirse a proteínas extracelulares mediante interacciones electrostáticas con los grupos del polisacárido cargados negativamente. Los proteoglucanos son los principales componentes de todas las matrices extracelulares.

Las **glucoproteínas** tienen uno o varios oligosacáridos de diversa complejidad unidos covalentemente a una proteína. Se encuentran normalmente en el lado externo de la membrana plasmática (formando parte del glucocálix), en la matriz extracelular y en la sangre. Dentro de las células, se encuentran en orgánulos específicos tales como los complejos de Golgi, los gránulos de secreción y los lisosomas. Las porciones oligosacáridas de las glucoproteínas son muy heterogéneas y, al igual que los glucosaminoglucanos, son ricas en información, formando sitios altamente específicos para el reconocimiento y la unión de elevada afinidad de las proteínas ligadoras de glúcidos llamadas lectinas. Algunas proteínas citosólicas y nucleares también pueden estar glucosiladas.

Los **glucolípidos** son esfingolípidos de membrana en los que los grupos hidrofílicos de cabeza son oligosacáridos. Del mismo modo que las glucoproteínas, actúan como sitios específicos para el reconocimiento por las lectinas. El cerebro y las neuronas contienen muchos glucolípidos los cuales colaboran en la conducción nerviosa y en la formación de mielina. Los glucolípidos también intervienen en la transducción de señales en las células.

Los proteoglucanos son macromoléculas de la superficie celular y de la matriz extracelular que contienen glucosaminoglucanos

Las células de mamífero pueden sintetizar 40 tipos de proteoglucanos. Estas moléculas actúan de organizadores titulares e influyen en diversas actividades celulares tales como la activación y adhesión del factor de crecimiento. La unidad básica de los proteoglucanos consiste en una "proteína núcleo" a la que se unen covalentemente uno o varios glucosaminoglucanos. La unión suele ser a través de un residuo de Ser, al que se une el glucosaminoglucano mediante un puente tetrasacárido **(Fig. 7–24)**. El residuo de Ser se encuentra generalmalmente en la secuencia –Ser–Gly–X–Gly– (en donde X es cualquier aminoácido); sin embargo, no todas las proteínas con esta secuencia tienen un glucosaminoglucano unido. Muchos proteo-

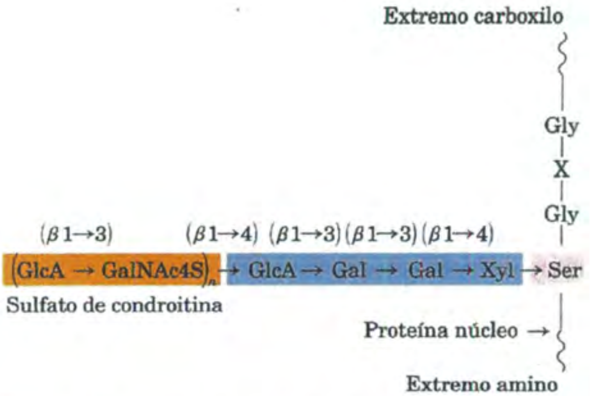


FIGURA 7–24 Estructura del proteoglucano, en la que se muestra el puente trisacárido. Un típico tetrasacárido de unión (en azul) conecta un glucosaminoglucano —en este caso sulfato de condroitina (en naranja)— con un residuo de Ser (en rojo) situado en la proteína núcleo. El residuo de xilosa situado en el extremo reductor del conector está unido por su carbono anomérico al grupo hidroxilo del residuo de Ser.

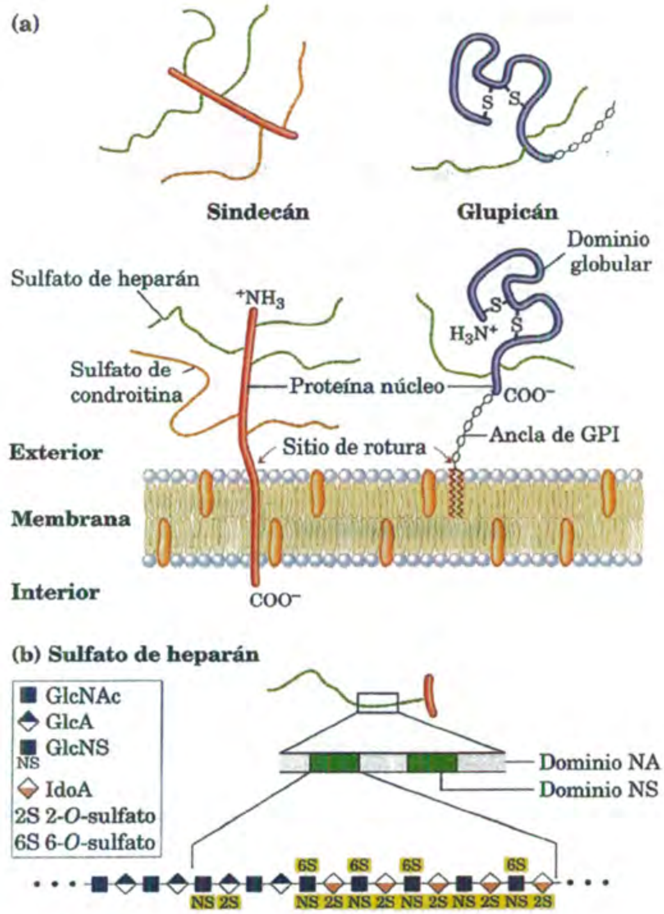


FIGURA 7–25 Dos familias de proteoglucano de membrana. (a) Este esquema muestra un sindecán y un glupicán de la membrana plasmática. Los sindecanos se mantienen unidos a la membrana mediante interacciones hidrofóbicas entre una secuencia de residuos aminoácidos apolares y lípidos de la membrana plasmática; pueden liberarse mediante un corte proteolítico sencillo cerca de la superficie de la membrana. En un sindecán típico el dominio amino-terminal del lado extracelular de la membrana se une covalentemente (por tetrasacáridos conectores tales como los de la Fig. 7–24) a tres cadenas de sulfato de heparán y dos cadenas de sulfato de condroitina. Los glupicanos se mantienen en la membrana mediante un lípido de membrana unido covalentemente (ancla GPI; véase el Capítulo 11) y se suelta si el enlace lípido-proteína se corta con una fosfolipasa. Todos los glupicanos tienen 14 residuos de Cys conservados, los cuales forman enlaces disulfuro para estabilizar la porción proteica y dos o tres cadenas de glucosaminoglucano unidas cerca del extremo carboxilo, cerca de la superficie de la membrana. **(b)** A lo largo de una cadena de sulfato de heparán, las regiones ricas en azúcares sulfatados, los dominios NS (verde), alternan con regiones de residuos de GlcNAc y GlcA no modificados, los dominios NA (gris). Uno de los dominios NS se muestra con más detalle para poner de manifiesto una alta densidad de residuos modificados: GlcNS, (*N*-sulfoglucosamina), con un éster sulfato en C-6; y GlcA e IdoA, con un éster sulfato en C-2. El patrón exacto de sulfatación del dominio NS difiere entre los proteoglucanos.

glucanos se secretan a la matriz extracelular, pero algunos son proteínas integrales de membrana (véase la Fig. 11–6). Por ejemplo, la matriz laminar extracelular (lámina basal), que separa grupos organizados de células, contiene una familia de proteínas núcleo (M_r 20.000 a 40.000), cada una con varias cadenas de sulfato de heparán unidas covalentemente. Existen dos familias de proteoglucanos de sulfato de heparán de membrana. Los **sindecanos** tienen un único dominio transmembrana y un dominio extracelular con tres a cinco cadenas de sulfato de heparán y, en algunos casos, de sulfato de condroitina **(Fig. 7–25a)**. Los **glupicanos** están unidos a la membrana por un anclaje lipídico, un derivado del lípido de membrana fosfatidil inositol (Capítulo 11). Tanto los sindecanos como los glupicanos pueden ser vertidos al espacio extracelular. Una proteasa de la ECM que corta en un punto cercano a la superficie de la membrana libera dominios de sindecán (dominios al exterior de la membrana plasmática) mientras que una fosfolipasa que rompe la conexión al lípido de membrana libera los glupicanos. También existe un gran número de proteoglucanos con sulfatos de condroitina y de dermatán, algunos de los cuales son entidades ligadas a la membrana mientras que otros son productos secretados a la ECM.

Las cadenas de glucosaminoglucanos pueden unirse a una gran variedad de ligandos extracelulares y de esta manera modulan la interacción de los ligandos con sus receptores específicos de la superficie celular. El examen detallado del sulfato de heparán ha mostrado que la estructura del dominio no es casual; algunos dominios (normalmente de una longitud de 3 a 8 unidades disacáridas de longitud) difieren de los dominios vecinos en secuencia y en capacidad para interaccionar con proteínas específicas. Los dominios altamente sulfatados (dominios NS) alternan con dominios que contienen residuos de GlcNAc y GlcA no modificados (dominios *N*-acetilados o NA) (Fig. 7–25b). El patrón exacto de sulfatación en los dominios NS depende de cada proteoglucano; dado el número de modificaciones posibles del dímero GlcNAc-IdoA, son posibles, al menos, 32 unidades distintas de disacárido. A ello hay que añadir que la misma proteína núcleo puede mostrar diferentes estructuras de sulfato de heparán cuando se sintetiza en diferentes tipos celulares.

Las propiedades de proteínas extracelulares y de moléculas de señalización se modifican a consecuencia de la unión específica a los dominios NS. El cambio en la actividad puede ser debido a un cambio conformacional en la proteína inducido por la unión **(Fig. 7–26a)** o a la capacidad de dominios adyacentes

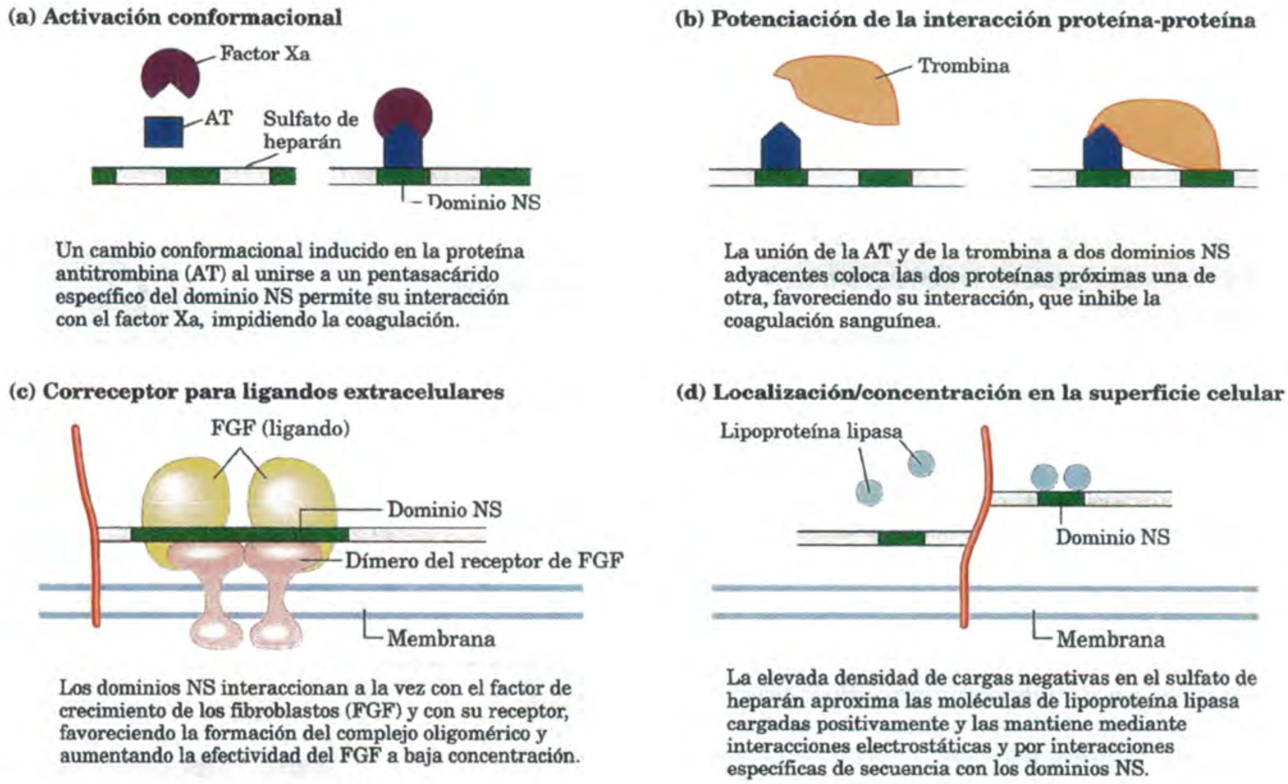


FIGURA 7–26 Cuatro tipos de interacciones proteicas con los dominios NS del sulfato de heparán.

de sulfato de heparán de unirse a dos proteínas y situarlas muy próximas de manera que se ven favorecidas las interacciones proteína-proteína (Fig. 7–26b). Un tercer mecanismo general de acción consiste en la unión de moléculas de señalización extracelulares (por ejemplo, factores de crecimiento) al sulfato de heparán, que tiene como consecuencia el aumento de la concentración local y una más fácil interacción con los receptores del factor de crecimiento en la superficie celular; en este caso el sulfato de heparán actúa de correceptor (Fig. 7–26c). Por ejemplo, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), una señal proteica extracelular que estimula la división celular, se une inicialmente a la porción de sulfato de heparán de moléculas de sindecán de la membrana plasmática de las células diana. El sindecán presenta el FGF a los receptores de FGF de la membrana plasmática, y sólo entonces el FGF puede interaccionar eficazmente con sus receptores para desencadenar la división celular. Finalmente, en otro tipo de mecanismo, los dominios NS interaccionan, electrostáticamente y de otros modos, con una gran variedad de moléculas solubles del exterior de la célula, manteniendo una elevada concentración local en la superficie celular (Fig. 7–26d).

La importancia de los dominios sulfatados sintetizados de manera correcta en el sulfato de heparán se pone de manifiesto en ratones mutantes genosuprimidos ("knockout") que carecen del enzima que introduce sulfato en el hidroxilo C-2 de IdoA. Estos animales nacen sin riñones y con graves anomalías en el desarrollo del esqueleto y los ojos. Otros estudios demuestran que los proteoglucanos de membrana son importantes en la eliminación de lipoproteínas en el hígado. Existen cada vez más pruebas de que la ruta seguida en el desarrollo de los axones en el sistema nervioso, y por tanto la formación de circuitos, depende de proteoglucanos que contienen sulfatos de heparán y sulfato de condroitina, los cuales proporcionan pistas para el rápido crecimiento de los axones.

Algunos proteoglucanos pueden formar **agregados de proteoglucano,** enormes agrupaciones supramoleculares de muchas proteínas núcleo unidas todas ellas a una única molécula de hialuronano. La proteína núcleo del agrecán (M_r ~250.000) tiene múltiples cadenas de sulfato de condroitina y de sulfato de queratán unidas a residuos de Ser de la proteína núcleo a través de trisacáridos de unión, para dar un monómero de agrecán de M_r ~2×10^6. Cuando un centenar o más de estas proteínas núcleo "decoradas" se unen a una única molécula de hialuronano extendida **(Fig. 7–27)**, el agregado de proteoglucano resultante (M_r >2×10^8) y su agua de hidratación asociada ocupan un volumen aproximadamente igual ¡al de una célula bacteriana! El agrecán interacciona fuertemente con el colágeno de la matriz extracelular del cartílago, contribuyendo a su desarrollo, a la resistencia a la tensión y a la elasticidad de este tejido conjuntivo.

Las proteínas fibrosas de la matriz tales como el colágeno, la elastina y la fibronectina se encuentran entrelazadas con estos enormes proteoglucanos extracelulares, formando una malla entrecruzada que proporciona resistencia y elasticidad al conjunto de la matriz extracelular. Algunas de estas proteínas son multiadhesivas, al tener una única proteína varios sitios de unión para diferentes moléculas de la matriz. La fibronectina, por ejemplo, tiene dominios distintos que unen la fibrina, el sulfato de heparán, el colágeno y una familia de proteínas de la membrana plasmática denominadas integrinas, que intervienen en la señalización entre el interior de la célula y la matriz extracelular (véase la Fig. 12–28). La imagen global que emerge de las interacciones célula-matriz **(Fig. 7–28)** muestra una serie

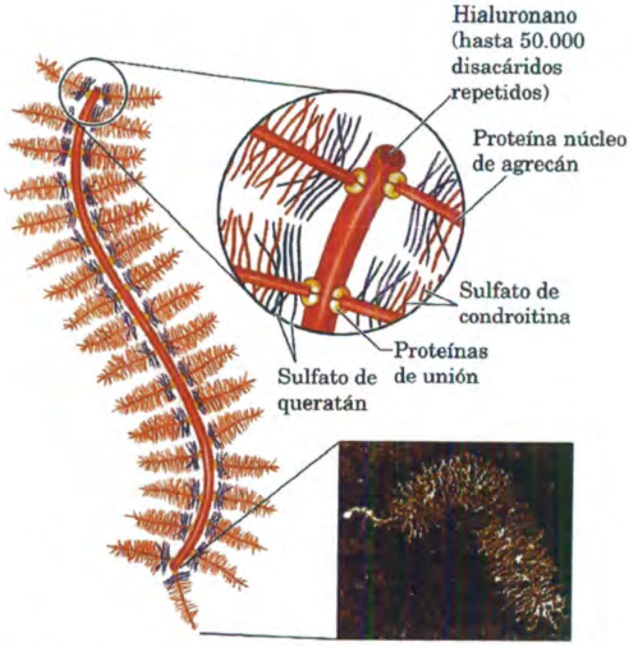


FIGURA 7–27 Agregado de proteoglucano de la matriz extracelular. Dibujo esquemático de un proteoglucano con muchas moléculas de agrecán. Una molécula de hialuronano de gran longitud se asocia de manera no covalente con unas 100 moléculas de la proteína núcleo agrecán. Cada molécula de agrecán contiene muchas moléculas de sulfato de condroitina y sulfato de queratán unidas covalentemente. Las proteínas de unión situadas en el punto de unión entre cada proteína núcleo y la espina central de hialuronano intervienen en la interacción proteína núcleo–hialuronano. La micrografía muestra una molécula individual de agrecán vista con el microscopio de fuerza atómica (véase el Recuadro 11–1).

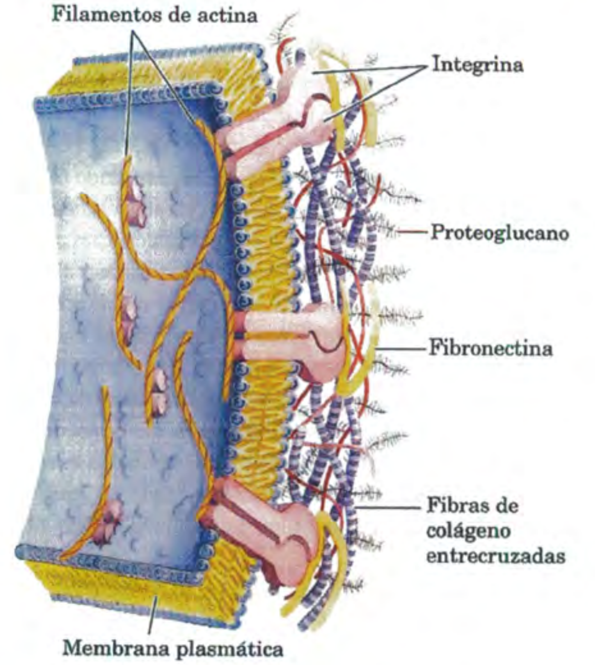


FIGURA 7–28 Interacciones entre las células y la matriz extracelular. En la asociación entre las células y los proteoglucanos de la matriz extracelular participan una proteína de membrana (integrina) y una proteína extracelular (fibronectina en este ejemplo), que posee sitios de unión tanto para las integrinas como para los proteoglucanos. Obsérvese la estrecha asociación de las fibras de colágeno con la fibronectina y el proteoglucano.

de interacciones entre moléculas celulares y extracelulares. Estas interacciones no sólo sirven para anclar las células a la matriz extracelular sino también para proporcionar vías que dirigen la migración de las células en el tejido en desarrollo y para transmitir información en ambas direcciones a través de la membrana plasmática.

Las glucoproteínas contienen oligosacáridos unidos covalentemente

Las glucoproteínas son conjugados de proteína y glúcidos en los que los glucanos son menores, están ramificados y son, estructuralmente, más diversos que los glucosaminoglucanos de los proteoglucanos. El glúcido se une por su carbono anomérico mediante un enlace glucosídico con el —OH de un residuo de Ser o Thr (*O*-unidos) o mediante un enlace *N*-glucosilo con el nitrógeno amídico de un residuo de Asn (*N*-unidos) **(Fig. 7–29)**. Algu-

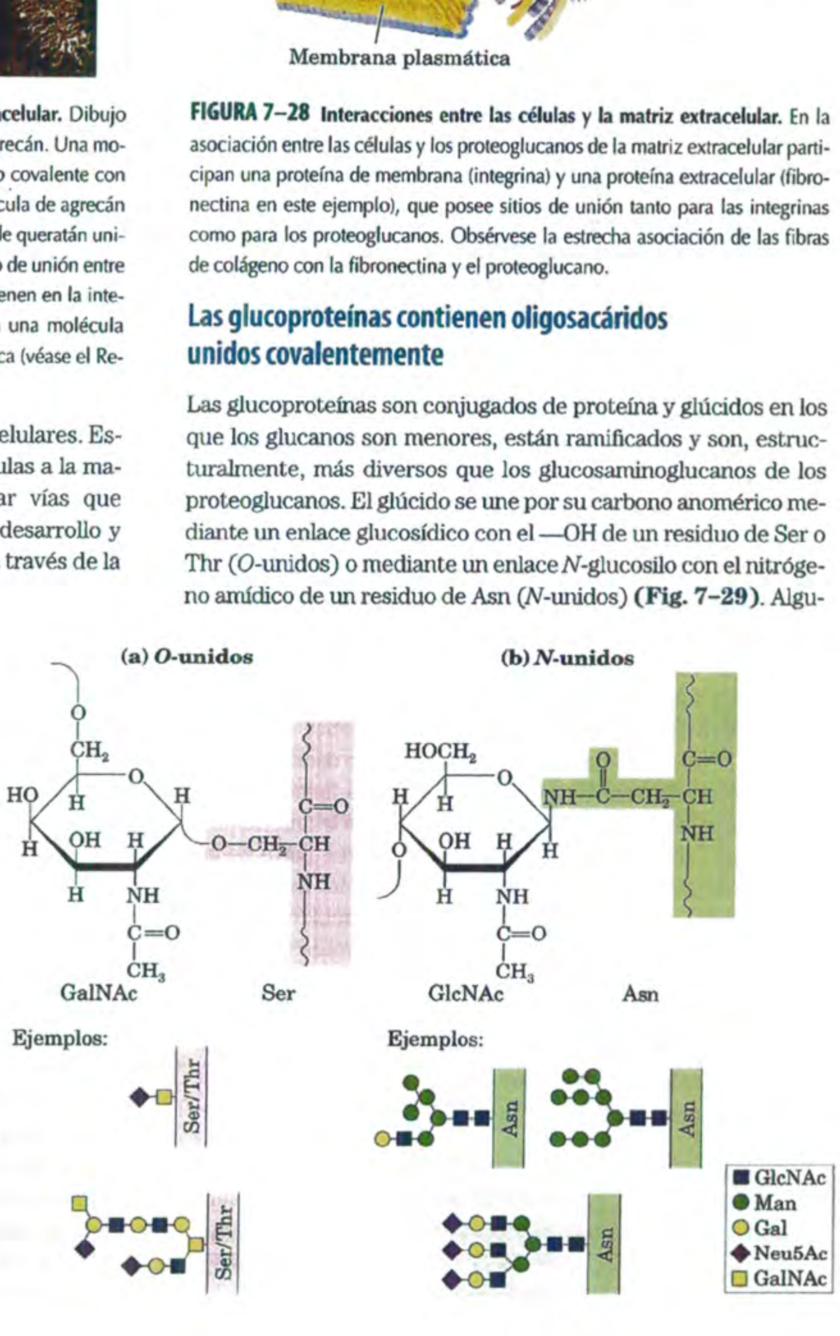


FIGURA 7–29 Unión de oligosacáridos a glucoproteínas. **(a)** Los oligosacáridos *O*-unidos tienen un enlace glucosídico con el grupo hidroxilo de residuos de Ser o Thr (sombreado en rosa), que aquí se ilustra con el GalNAc como azúcar en el extremo reductor del oligosacárido. Se muestra una cadena simple y una compleja. **(b)** Los oligosacáridos *N*-unidos tienen un enlace *N*-glucosídico con el nitrógeno amídico de la Asn (sombreado en verde), que aquí se ilustra con el GlcNAc como azúcar terminal. Se muestran tres cadenas de oligosacáridos comunes de las glucoproteínas que están *N*-unidas. Una descripción completa de la estructura del oligosacárido requiere la especificación de la posición y estereoquímica (α o β) de cada enlace glucosídico.

nas glucoproteínas tienen una sola cadena de oligosacárido, pero muchas tienen más de una; el glúcido puede representar del 1% al 70% o más de la masa de la glucoproteína. Las **mucinas** son glucoproteínas de secreción o de membrana que pueden contener grandes cantidades de cadenas de oligosacárido *O*-unidas. Las mucinas se encuentran en la mayoría de secreciones; confieren al moco su tacto resbaladizo característico. Cerca de la mitad de las proteínas de mamíferos están glucosiladas y alrededor de un 1% de todos los genes de mamíferos codifican enzimas que intervienen en la síntesis y unión de estas cadenas oligosacáridas. Las secuencias para la unión de cadenas *O*-unidas tienden a ser ricas en residuos Gly, Val y Pro. Por el contrario, la unión de cadenas *N*-unidas depende de la secuencia consenso N–{P}–[ST] (véase el recuadro 3-3 sobre las convenciones para representar las secuencias consenso). Al igual que con los proteoglucanos, no se utiliza la totalidad de los sitios potenciales.

Hay una clase de glucoproteínas, que se encuentran en el citoplasma y en el núcleo, con la singularidad de que las posiciones glucosiladas de la proteína son sólo portadoras de residuos sencillos de *N*-acetilglucosamina, en enlace *O*-glucosídico con el grupo hidroxilo de cadenas laterales de Ser. Esta modificación es reversible y, a menudo, tiene lugar sobre los mismos residuos de Ser que se fosforilan en algún paso de la actividad de la proteína. Las dos modificaciones son mutuamente excluyentes, por lo que puede que este tipo de glucosilación sea importante en la regulación de la actividad proteica. Se analizará este punto en el contexto de la fosforilación de proteínas en el Capítulo 12.

Tal como veremos en el Capítulo 11, la superficie externa de la membrana plasmática tiene muchas glucoproteínas de membrana con una serie de oligosacáridos de complejidad variable unidos covalentemente. La primera glucoproteína de membrana bien caracterizada fue la glucoforina A de la membrana de los eritrocitos (véase la Fig. 11–7). Contiene un 60% (en masa) de glúcidos en forma de 16 cadenas de oligosacáridos (con un total de 60 a 70 unidades de monosacárido), unidas covalentemente a residuos aminoácidos próximos al extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica. Quince cadenas de oligosacárido están *O*-unidas a residuos de Ser o de Thr y una está *N*-unida a un residuo de Asn.

La **glucómica** es la caracterización sistemática de todos los componentes glucídicos de una célula o tejido dados, incluidos lo que se encuentran ligados a proteínas y a lípidos. En el caso de las glucoproteínas, esto también significa la determinación de qué proteínas están glucosiladas y en qué parte de la secuencia aminoácido está unido el oligosacárido. Éste es un desafío de gran magnitud, pero que vale la pena debido a los conocimientos potenciales que ofrece sobre los patrones normales de glucosilación y sobre las vías en los que están alterados durante el desarrollo, en las enfermedades genéticas o en el cáncer. Los métodos actuales para caracterizar el complemento glucídico completo de las células dependen fundamentalmente de una aplicación sofisticada de la espectroscopia de masas (véase la Fig. 7–37).

Se conocen las estrucuras de muchos oligosacáridos *O*-unidos y *N*-unidos de un buen número de glucoproteínas; la Figura 7-29 muestra unos cuantos ejemplos típicos. En el Capítulo 27 se estudian los mecanismos por los que proteínas específicas adquieren porciones oligosacáridas específicas.

Muchas de las proteínas secretadas por las células eucarióticas son glucoproteínas, entre ellas la mayoría de las proteínas de la sangre. Por ejemplo, las inmunoglobulinas (anticuerpos) y ciertas hormonas, tales como la hormona estimuladora del folículo, la hormona luteinizante y la hormona estimuladora del tiroides, son glucoproteínas. Muchas proteínas de la leche, incluida la lactalbúmina y algunas de las proteínas secretadas por el páncreas (por ejemplo, la ribonucleasa), están glucosiladas, como también lo están la mayoría de las proteínas contenidas en los lisosomas.

Lentamente se empiezan a conocer las ventajas biológicas derivadas de añadir oligosacáridos a las proteínas. Las agrupaciones de glúcidos muy hidrofílicos modifican la polaridad y la solubilidad de las proteínas a las que están conjugados. Las cadenas de oligosacáridos, unidas a las proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE) y elaboradas en el complejo de Golgi, sirven de etiqueta de destino y también como control de calidad de la proteína, ya que dirigen las proteínas mal plegadas hacia su degradación (véase la Fig. 27-39). Cuando numerosas cadenas de oligosacáridos cargadas negativamente están agrupadas en una región de la proteína, la repulsión entre las cargas favorece la formación de estructuras en varilla rígida en esta región. El volumen y las cargas negativas de las cadenas de oligosacárido también protegen a algunas proteínas de los ataques por enzimas proteolíticos. Además de estos efectos físicos globales sobre la estructura de las proteínas, las cadenas de oligosacárido también producen efectos biológicos más específicos en las glucoproteínas (Sección 7.4). La importancia de la glucosilación normal de las proteínas está clara debido al descubrimiento de que al menos 18 enfermedades genéticas diferentes en humanos debidas a la glucosilación, producen desarrollo físico o mental defectuoso grave; algunas de estas enfermedades son mortales.

Los glucolípidos y los lipopolisacáridos son componentes de membrana

Las glucoproteínas no son los únicos componentes celulares que contienen cadenas complejas de oligosacáridos; también algunos lípidos contienen cadenas de oligosacáridos covalentemente unidas. Los **gangliósidos** son lípidos de membrana de las células eucarióticas cuyo grupo de cabeza polar, la parte del lípido que forma la superficie externa de la membrana, es un oligosacárido complejo que contiene ácido siálico (Fig. 7–9) y otros residuos de monosacárido. Algunas de las porciones oligosacáridas de los gangliósidos, como, por ejemplo, aquellas que determinan los grupos sanguíneos humanos (véase la Fig. 10–15), son idénticas a las encontradas en ciertas glucoproteínas y que, por tanto, también contribuyen a la determinación del grupo sanguíneo. Al igual que en el caso de la porción oligosacárida de las glucoproteínas, la de los lípidos de membrana se encuentra generalmente, tal vez siempre, en la cara externa de la membrana plasmática.

Los **lipopolisacáridos** son los componentes principales de la membrana externa de las bacterias gram-negativas tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Estas moléculas son las dianas principales de los anticuerpos producidos por el sistema inmunitario de los vertebrados en respuesta a la infección bacteriana y son, por tanto, determinantes

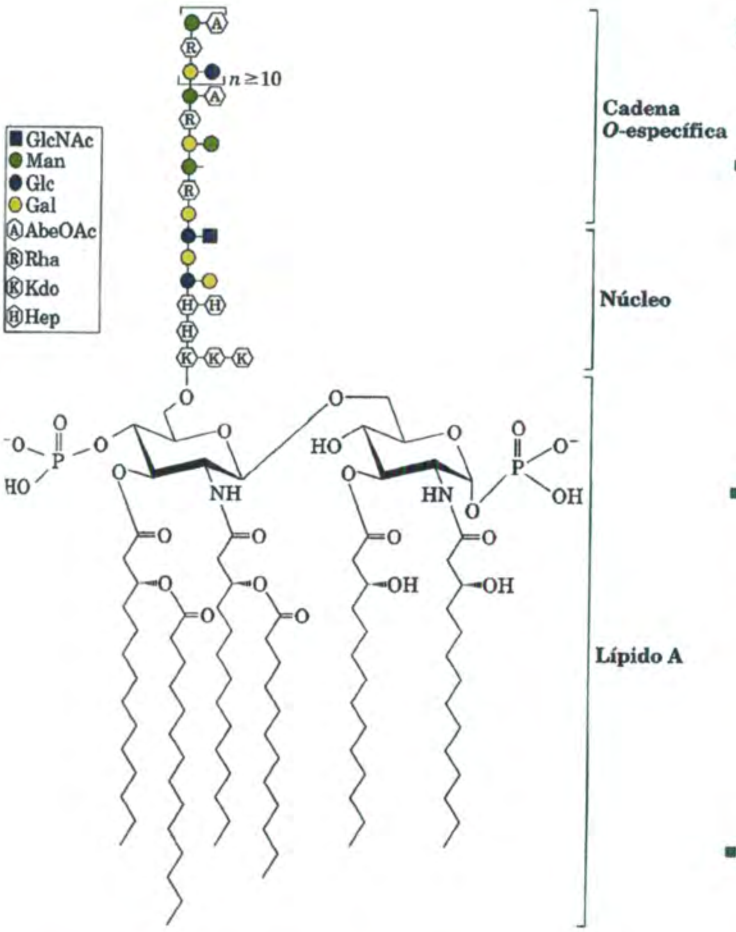


FIGURA 7–30 Lipopolisacáridos bacterianos. (a) Esquema del lipopolisacárido de la membrana externa de *Salmonella typhimurium*. Kdo es el ácido 3-desoxi-D-*mano*-octulosónico, llamado anteriormente ácido cetodesoxioctónico; Hep es L-*glicero*-D-*mano*-heptosa; AbeOAc es abecuosa (una 3,6-didesoxihexosa), acetilada en uno de sus hidroxilos. Hay seis residuos de ácido graso en la porción del lípido A de la molécula. Diversas especies bacterianas tienen estructuras de lipopolisacáridos ligeramente diferentes, pero tienen en común una región lipídica (lípido A), un núcleo oligosacárido, también conocido como endotoxina y una cadena "*O*-específica", que es el determinante principal del serotipo (reactividad inmunológica) de la bacteria. La membrana externa de las bacterias gram-negativas *S. typhimurium* y *E. coli* contienen tantas moléculas de polisacáridos que la superficie celular está prácticamente recubierta con cadenas *O*-específicas.

importantes del serotipo de las cepas bacterianas (los serotipos son cepas que se distinguen por sus propiedades antigénicas). Los lipopolisacáridos de *S. typhimurium* contienen seis ácidos grasos unidos a dos residuos de glucosamina, uno de los cuales es el punto de unión de un oligosacárido complejo **(Fig. 7–30)**. *E. coli* posee lipopolisacáridos similares, pero singulares. La porción lípido A de los lipopolisacáridos de algunas bacterias se denomina endotoxina; su toxicidad para los humanos y otros animales es responsable del peligroso descenso de la presión sanguínea que se produce durante el síndrome del shock tóxico, resultado de una infección causada por bacterias gram-negativas. ■

RESUMEN 7.3 Glucoconjugados: proteoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos

- Los proteoglucanos son glucoconjugados en los cuales la proteína núcleo está unida covalentemente a uno o más glucanos de gran tamaño, denominado sulfato de glucosaminoglucano (sulfato de heparán, sulfato de condroitina o sulfato de queratán). Unidos al exterior de la membrana plasmática por un péptido de transmembrana o un lípido unido covalentemente, los proteoglucanos proporcionan puntos de adhesión, de reconocimiento y de transferencia de información entre células o entre la célula y la matriz extracelular.
- Las glucoproteínas contienen oligosacáridos unidos covalentemente a través de residuos Asp o Ser/Thr. Los glucanos normalmente están ramificados y son de menor tamaño que los glucosaminoglucanos. Muchas proteínas de la superficie celular o extracelulares son glucoproteínas, tal como es el caso de la mayoría de las proteínas secretadas. Los oligosacáridos unidos covalentemente influyen en el plegamiento y en la estabilidad de las proteínas, suministran información esencial para el destino de las proteínas recién sintetizadas y hacen posible el reconocimiento específico por otras proteínas.
- La glucómica consiste en la determinación del complemento completo de las moléculas que contienen azúcares en una célula o tejido y en la determinación de la función de cada una de estas moléculas.
- Los glucolípidos en plantas y animales y los lipopolisacáridos en las bacterias son componentes de la cubierta celular con cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente, expuestas en la superficie exterior de la célula.

7.4 Los glúcidos son moléculas que contienen información: el código de los azúcares

La glucobiología, definida como el estudio de la estructura y función de los gluconjugados, es una de las más activas y estimulantes áreas de la bioquímica y de la biología celular. Cada vez está más claro que las células utilizan oligosacáridos específicos para codificar información importante acerca del destino intracelular de las proteínas, sobre las interacciones intercelulares, la diferenciación celular, el desarrollo de los tejidos y las señales extracelulares. Discutiremos unos pocos ejemplos para ilustrar la diversidad de la estructura y la variedad de actividades biológicas de los glucoconjugados. En el Capítulo 20 estudiaremos la biosíntesis de los polisacáridos, entre ellos los proteoglucanos y, en el Capítulo 27, la construcción de las cadenas de oligosacáridos de las glucoproteínas.

La mejora de los métodos de análisis de la estructura de los oligosacáridos y polisacáridos ha puesto de manifiesto la sorprendente complejidad y diversidad de los oligosacáridos de las glucoproteínas y glucolípidos. Considere las cadenas de oligosacárido de la Figura 7–29, representativas de las encontradas en muchas glucoproteínas. Las más complejas contienen 14 residuos de monosacárido de cuatro tipos diferentes, unidas por

enlaces diversos tales como (1→2), (1→3), (1→4), (1→6), (2→3) y (2→6), algunos en configuración α y otros en configuración β. Las estructuras ramificadas, que no se encuentran en los ácidos nucleicos o en las proteínas, son frecuentes en los oligosacáridos. Partiendo de la suposición razonable de que para la síntesis de los oligosacáridos disponemos de 20 monosacáridos distintos, podemos calcular que son posibles muchos miles de millones de oligosacáridos hexaméricos distintos, en comparación con los $6{,}4 \times 10^7$ (20^6) diferentes hexapéptidos posibles con los veinte aminoácidos comunes y los 4.096 (4^6) hexanucleótidos diferentes con los cuatro nucleótidos. Si además tenemos en cuenta las variaciones en los oligosacáridos que resultan de la sulfatación de uno o más residuos, el número de oligosacáridos posibles aumenta en dos órdenes de magnitud. De hecho, sólo se encuentra un subconjunto de combinaciones debido a las restricciones impuestas por los enzimas biosintéticos y por la disponibilidad de precursores. No obstante, la enorme riqueza de información estructural presente en los glucanos no sólo rivaliza sino que supera ampliamente la de los ácidos nucleicos en densidad de información contenida en una molécula de tamaño modesto. Cada uno de los oligosacáridos representados en la Figura 7–29 presenta un aspecto tridimensional único —una palabra del código de los azúcares— reconocible por proteínas específicas que interaccionan con ellas.

Las lectinas son proteínas que leen el código de los azúcares y que intervienen en muchos procesos biológicos

Las **lectinas,** presentes en todos los organismos, son proteínas que se unen a los glúcidos con una elevada especificidad y una afinidad entre moderada y alta (Tabla 7–3). Las lectinas actúan en muchos procesos de reconocimiento intercelular, señalización y adhesión y en el destino intracelular de proteínas recién sintetizadas. Las lectinas vegetales, abundantes en las semillas, sirven, probablemente, de disuasores para los insectos y otros depredadores. En el laboratorio, las lectinas vegetales purificadas se utilizan como reactivos útiles para la detección y separación de glucoproteínas con porciones oligosacáridas diferentes. Aquí sólo discutiremos unos pocos ejemplos de las funciones de las lectinas en las células animales.

Algunas homonas peptídicas que circulan en la sangre tienen porciones de oligosacárido que influyen decisivamente en su vida media en circulación. La hormona luteinizante y la tirotropina (hormonas polipeptídicas producidas en la corteza suprarrenal) tienen oligosacáridos *N*-unidos que terminan con el disacárido GalNAc4S(β1→4)GlcNAc, que es reconocido por una lectina (receptor) de los hepatocitos. (GalNAc4S es la *N*-acetilgalactosamina sulfatada en el grupo —OH del C-4.) La interacción hormona–receptor interviene en la captación y degradación de la hormona luteinizante y la tirotropina, reduciendo su concentración en sangre. De este modo, los niveles en sangre de estas hormonas experimentan un aumento (debido a la secreción pulsátil por la corteza suprarrenal) y una disminución (debido a la destrucción por los hepatocitos) periódicos.

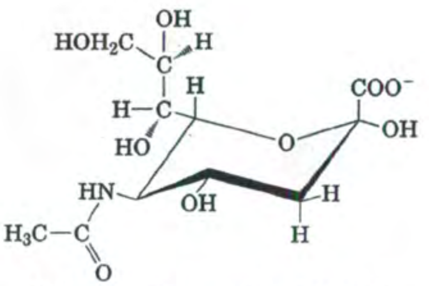
Los residuos de Neu5Ac (un ácido siálico) situados en los extremos de las cadenas de oligosacáridos de muchas glucoproteínas plasmáticas (Fig. 7–29) protegen a esas proteínas de la captación y degradación por el hígado. Por ejemplo, la ceruloplasmina es una glucoproteína sérica que contiene cobre y que posee varias cadenas de oligosacárido que terminan en Neu5Ac. No está claro el mecanismo de eliminación de los residuos de ácido siálico de las glucoproteínas séricas. Puede ser debido a la actividad del enzima sialidasa (también denominado neuraminidasa) producido por los organismos invasores o a una liberación lenta pero continuada de enzimas extracelulares. La membrana plasmática de los hepatocitos tiene moléculas de lectina (receptores de asialoglucoproteínas; "asialo-" indica "sin ácido siálico") que se unen específicamente a las cadenas de oligosacáridos con residuos de galactosa que ya no están "protegidos" por un residuo terminal de Neu5Ac. La interacción receptor-ce-

TABLA 7–3 Algunas lectinas y los ligandos oligosacáridos a los que se unen

Lectina y su procedencia	Abreviatura	Ligando(s)
Vegetal		
Concanavalina A	ConA	Manα1—OCH_3
Griffonia simplicifolia lectina 4	GS4	Tetrasacárido Lewis b (Le^b)
Aglutinina de germen de trigo	WGA	Neu5Ac(α2→3)Gal(β1→4)Glc
		GlcNAc(β1→4)GlcNAc
Ricina		Gal(β1→4)Glc
Animal		
Galectina-1		Gal(β1→4)Glc
Proteína A de unión a manosa	MBP-A	Octasacárido rico en manosa
Vírica		
Hemaglutinina del virus de la gripe	HA	Neu5Ac(α2→6)Gal(β1→4)Glc
Proteína 1 del virus Polioma	VP1	Neu5Ac(α2→3)Gal(β1→4)Glc
Bacteriana		
Enterotoxina	LT	Gal
Toxina del cólera	CT	Pentasacárido GM1

Fuente: Weiss, W.I. & Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 441–473.

ruloplasmina provoca la endocitosis y la destrucción de la ceruloplasmina.



Ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac)
(un ácido siálico)

Parece ser que un mecanismo similar es responsable de la eliminación de los eritrocitos "viejos" de la sangre de mamíferos. Los eritrocitos recién sintetizados tienen varias glucoproteínas de membrana con cadenas de oligosacárido que terminan en Neu5Ac. Cuando se eliminan los residuos de ácido siálico al retirar una muestra de sangre de animales de experimentación por tratamiento con sialidasa in vitro y posteriormente se reintroduce la muestra en el torrente circulatorio, los eritrocitos tratados desaparecen de la circulación sanguínea en el plazo de pocas horas; los eritrocitos con los oligosacáridos intactos (extraídos y reintroducidos sin tratamiento con sialidasa) continúan circulando durante días.

Las lectinas de la superficie celular –tanto las lectinas humanas como las lectinas de los agentes infecciosos– son importantes en el desarrollo de algunas enfermedades humanas. Las **selectinas** son una familia de lectinas que se encuentran en la membrana plasmática y que intervienen en el reconocimiento y adhesión intercelular en una amplia gama de procesos celulares. Uno de estos procesos es el movimiento de las células del sistema inmune (neutrófilos) a través de las paredes de los capilares, desde la sangre hacia los tejidos en los lugares de infección o inflamación **(Fig. 7–31)**. En una zona infectada, la P-selectina de la superficie de los capilares de las células endoteliales interacciona con un oligosacárido específico de las glucoproteínas de los neutrófilos circulantes. Esta interacción frena el movimiento de los neutrófilos cuando se adhieren y ruedan a lo largo del revestimiento endotelial de los capilares. Una segunda interacción, entre las moléculas de integrina (p. 455) de la membrana plasmática de los neutrófilos y una proteína de adhesión de la superficie endotelial de la célula, detiene ahora los neutrófilos y hace posible su paso a través de la pared del capilar hacia los tejidos infectados para iniciar el ataque inmunológico. Otras dos selectinas participan en esta "vuelta a casa de los linfocitos": la E-selectina en las células endoteliales y la L-selectina en los neutrófilos se unen a sus correspondientes oligosacáridos del neutrófilo y de la célula endotelial, respectivamente.

Las selectinas humanas intervienen en las respuestas inflamatorias asociadas a la artritis reumatoide, asma, psoriasis, esclerosis múltiple y en el rechazo de órganos trasplantados, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de fármacos que inhiban la adhesión celular producida por selectinas. Muchos carcinomas expresan un antígeno que normalmente sólo está presente en las células fetales (sialil Lewis x o sialil Le^x) que

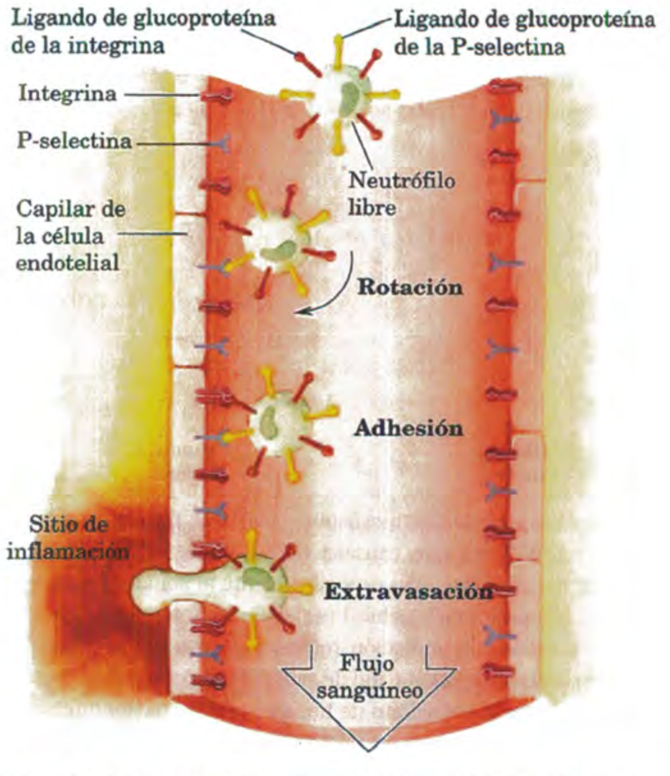
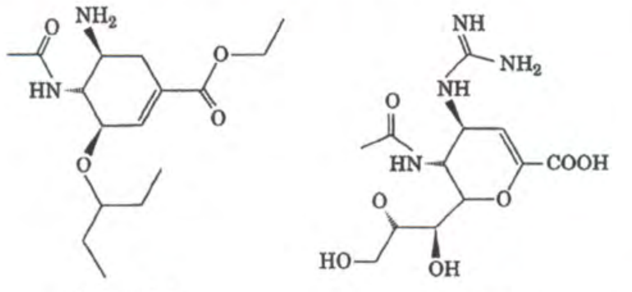


FIGURA 7–31 Papel de las interacciones lectina–ligando en el movimiento de los linfocitos hacia el lugar de una infección o una lesión. Un neutrófilo que circula por un capilar se retrasa debido a interacciones transitorias entre las moléculas de P-selectina de la membrana plasmática de las células endoteliales del capilar y los ligandos glucoproteicos de la P-selectina situados en la superficie del neutrófilo. A medida que interacciona con sucesivas moléculas de P-selectina, los neutrófilos ruedan a lo largo de la superficie del capilar. En las proximidades de la zona de inflamación, interacciones más fuertes entre la integrina de la superficie del capilar y sus ligandos en la superficie del neutrófilo conducen a una fuerte adhesión. El neutrófilo deja de rodar y, bajo la influencia de señales procedentes de la zona de inflamación, comienza la extravasación —paso a través de la pared del capilar— mientras se dirige al lugar de la inflamación.

cuando se introduce en la circulación facilita la supervivencia de las células tumorales y la metástasis. Derivados glucídicos que imitan la porción sialil Le^x de las sialoglucoproteínas o que alteran la biosíntesis del oligosacárido podrían ser efectivos como fármacos específicos de selectina para tratar la inflamación crónica o la enfermedad metastásica.

Diversos virus animales, entre los que se encuentra el virus de la gripe, se unen a sus células huésped a través de interacciones con oligosacáridos expuestos en la superficie de la célula huésped. La lectina del virus de la gripe, conocida como proteína HA (hemaglutinina), es esencial para la entrada del virus y posterior infección. Después de la entrada del virus en una célula huésped y de su replicación, las partículas víricas recién sintetizadas salen de la célula por gemación envueltas en una porción de su membrana plasmática. Una sialidasa vírica (neuraminidasa) corta el residuo terminal de ácido siálico de los oligosacáridos de la célula huésped, lo que libera las partículas víricas de su interacción con la célula e impide su agregación con otra. Puede iniciarse ahora otra ronda de infección. Los fármacos antivíricos oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza) (p. siguiente) se utilizan clínicamente en el tratamiento de la gripe. Estos medicamentos son análogos de azúcares; inhiben la sialidasa vírica al competir con

los oligosacáridos de la célula huésped para unirse a ella. Esto impide la liberación de virus del interior de la célula infectada al mismo tiempo que induce la agregación de las partículas víricas, dos procesos que bloquean el ciclo de infección siguiente.



Oseltamivir (Tamiflu)

Zanamivir (Relenza)

Las lectinas de la superficie de los virus herpes simples HSV-1 y HSV-2 (agentes causales de los herpes oral y genital, respectivamente) se unen específicamente al sulfato de heparán de la superficie de la célula huésped en el primer paso del ciclo de infección; la infección requiere de manera precisa el patrón correcto de sulfatación de este polímero. Se están investigando análogos del sulfato de heparán que imitan su interacción con los virus para su posible uso como medicamentos antivíricos al interferir en las interacciones entre virus y célula.

Algunos patógenos microbianos tienen lectinas que intervienen en la adhesión bacteriana a las células huésped o en la entrada de toxinas en las células. Por ejemplo, la bacteria *Helicobacter pylori*, que Barry J. Marshall y J. Robin Warren demostraron que era responsable de la mayoría de las úlceras gástricas, se adhiere a la superficie interior del estómago mediante interacciones entre las lectinas de la membrana bacteriana con oligosacáridos específicos de las glucoproteínas de la membrana de las células epiteliales gástricas (**Fig. 7–32**). Entre los sitios de unión que reconoce *H. pylori* se encuentra el oligosacárido Lewis b (Le^b) cuando éste forma parte del determinante del grupo sanguíneo de tipo O. Esta observación ayuda a explicar la incidencia varias veces superior de úlceras gástricas en las personas del grupo sanguíneo O respecto a las de tipo A o B. Los análogos del oligosacárido Le^b sintetizados químicamente podrían ser de utilidad en el tratamiento de este tipo de úlceras. Administrados oralmente, podrían impedir la adhesión bacteriana (y, por tanto,

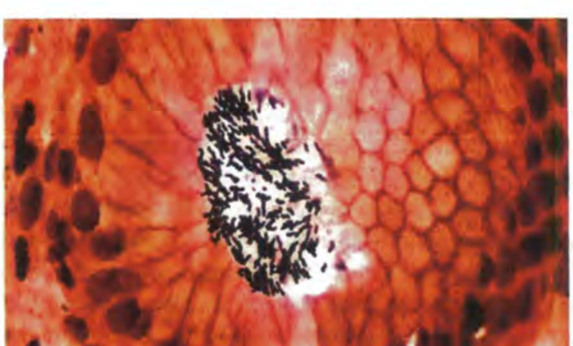


FIGURA 7–32 Una úlcera en desarrollo. Las células de *Helicobacter pylori* se adhieren a la superficie gástrica. Esta bacteria produce úlceras debidas a las interacciones entre una lectina de la superficie bacteriana y el oligosacárido Le^b (un antígeno de grupo sanguíneo) del epitelio gástrico.

Barry J. Marshall

J. Robin Warren

la infección) compitiendo con las glucoproteínas gástricas por la unión a las lectinas bacterianas.

Algunas de las enfermedades parasitarias humanas más devastadoras, de gran incidencia en gran parte de los países en vías de desarrollo, están causadas por microorganismos eucarióticos que exhiben unos oligosacáridos de superficie poco frecuentes que, en algunos casos, se ha visto que protegen al parásito. Entre estos organismos se cuentan los tripanosomas responsables de la enfermedad del sueño africana y la enfermedad de Chagas; *Plasmodium falciparum*, que es el parásito de la malaria, y *Entamoeba histolytica*, agente causal de la disentería amebiana. La perspectiva de encontrar fármacos que interfieran con la síntesis de estas cadenas de oligosacárido raras y, por consiguiente, con la replicación de los parásitos, ha inspirado muchos trabajos realizados recientemente sobre las rutas biosintéticas de estos oligosacáridos excepcionales.

La molécula de la toxina del cólera (producida por *Vibrio cholerae*) provoca diarrea tras su entrada en las células intestinales responsables de la absorción de agua en el intestino. La toxina se une a la célula diana a través de la porción de oligosacárido del gangliósido GM1, un fosfolípido de membrana (para la estructura de GM1, véase el Recuadro 10–2, Fig.1), de la superficie de las células epiteliales intestinales. De igual manera, la toxina pertusis, producida por *Bordetella pertussis*, la bacteria que causa la tos ferina, penetra en las células diana sólo después de interaccionar con un oligosacárido de la célula huésped (o quizá varios oligosacáridos) que posea un residuo terminal de ácido siálico. El conocimiento de los detalles de los lugares de unión de los oligosacáridos a estas toxinas (lectinas) permite el diseño, mediante ingeniería genética, de análogos de las toxinas para su uso como vacunas. Análogos de toxinas diseñados para que carezcan del sitio de unión de glúcidos serían inocuos, pues no podrían unirse ni entrar en las células pero podrían provocar una respuesta inmunitaria que protegería al receptor en una posterior exposición a la toxina natural. También es posible imaginar fármacos que actuarían imitando a los oligosacáridos de la superficie celular, uniéndose a las lectinas bacterianas o a las toxinas e impidiendo así la unión a las superficies celulares.

Las lectinas también actúan en el interior de la célula. Las proteínas recién sintetizadas destinadas a los lisosomas se marcan en el complejo de Golgi con un oligosacárido que contiene manosa 6-fosfato (véase la Fig. 27–39). Una característica estructural común de la superficie de estas glucoproteínas, la región señal, las hace reconocibles por un enzima que fosforila (en un procesos de dos pasos) un residuo de manosa en el extremo de la cadena de un oligosacárido. El residuo de manosa 6-fosfato resultante es reconocido entonces por el receptor de manosa

6-fosfato dependiente de cationes, una lectina asociada a la membrana con el sitio de unión de manosa fosfato en el lado de la luz del complejo de Golgi. Cuando una sección del complejo de Golgi que contiene este receptor se evagina para formar una vesícula de transporte, las proteínas que contienen residuos de manosa fosfato son arrastradas hacia el interior de la evaginación en formación, debido a la interacción de sus fosfatos de manosa con el receptor; a continuación la vesícula se desplaza y se fusiona con un lisosoma, donde deposita su carga. Muchos, tal vez todos los enzimas degradativos (hidrolasas) de los lisosomas son dirigidos y entregados mediante este mecanismo. Algunos de los receptores de manosa 6-fosfato pueden capturar enzimas que contengan el residuo manosa 6-fosfato y enviarlos hacia el lisosoma. Este proceso constituye la base de la "terapia de reemplazamiento enzimático" que corrige los defectos de almacenamiento lisosómico en los humanos. ■

Otras lectinas actúan en otros tipos de separación de proteínas. Cada proteína recién sintetizada en el retículo endoplasmático ya contiene un oligosacárido complejo unido que puede ser ligado por una de entre dos lectinas del RE que tambien son chaperonas: la **calnexina** (ligada a la membrana) o la **calreticulina** (soluble). Estas lectinas unen la nueva proteína con un enzima que cataliza el rápido intercambio de disulfuros a medida que la proteína explora las diferentes vías de plegamiento hasta llegar, finalmente, a la conformación nativa. En este punto, enzimas del RE recortan la porción oligosacárida hasta una forma que es reconocida por otra lectina, la ERGIC53, que lleva la proteína plegada (glucoproteína) al complejo de Golgi para su maduración posterior. Si una proteína no se ha plegado correctamente, el oligosacárido es recortado a otra forma que es reconocida por una lectina, la EDEM, que inicia el desplazamiento de la proteína plegada defectuosamente hacia el citosol en donde será degradada. Así, la glucosilación de proteínas en el RE constituye una especie de señal de control de calidad que permite a la célula eliminar proteínas plegadas incorrectamente. (Este proceso se describe con mayor detalle en el Capítulo 27.)

Las interacciones lectina–glúcido son muy específicas y, a menudo, polivalentes

En todas las funciones de las lectinas que han sido descritas, y en muchas otras en las que se sabe que intervienen interacciones lectina–oligosacárido, es esencial que el oligosacárido posea una estructura única y singular, con el fin de que el reconocimiento por la lectina sea altamente específico. La gran densidad de información de los oligosacáridos proporciona un código de los azúcares con un número virtualmente ilimitado de "palabras" diferentes suficientemente pequeñas para ser leídas por una única proteína. En sus sitios de unión de glúcidos, las lectinas poseen una sutil complementariedad molecular necesaria para permitir la interacción solamente con los glúcidos adecuados. El resultado es una extraordinariamente elevada especificidad de estas interacciones. La afinidad entre un oligosacárido y cada dominio de unión de glúcido (CBD, Carbohydrate Binding Domain) de una lectina es a veces modesto (valores de K_d micromolar a milimolar), pero la afinidad efectiva se incrementa grandemente en muchos casos por la multivalencia de la lectina, en la que una única molécula de lectina tiene múltiples CBD. En un agrupamiento de oligosacáridos —tal como, por ejemplo, se encuentra frecuentemente en una superficie de membrana— cada oligosacárido puede ocupar uno de los CBD de la lectina, con lo que se refuerza la interacción. Cuando las células expresan múltiples receptores, la afinidad de la interacción puede ser muy elevada, permitiendo procesos altamente cooperativos tales como la unión celular y la rotación (véase la Fig. 7–31).

Los estudios de difracción de rayos X de la estructura de varios complejos lectina–glúcido han suministrado muchos detalles de la interacción lectina-azúcar (**Fig. 7–33**). En los humanos, una familia de 11 lectinas que se unen a cadenas de oligosácaridos que acaban con residuos de ácido siálico juega papeles biológicos importantes. Todas estas lectinas unen ácidos siálicos en dominios en β sándwich iguales que los que se encuentran en inmunoglobulinas (Ig; véase este motivo en la

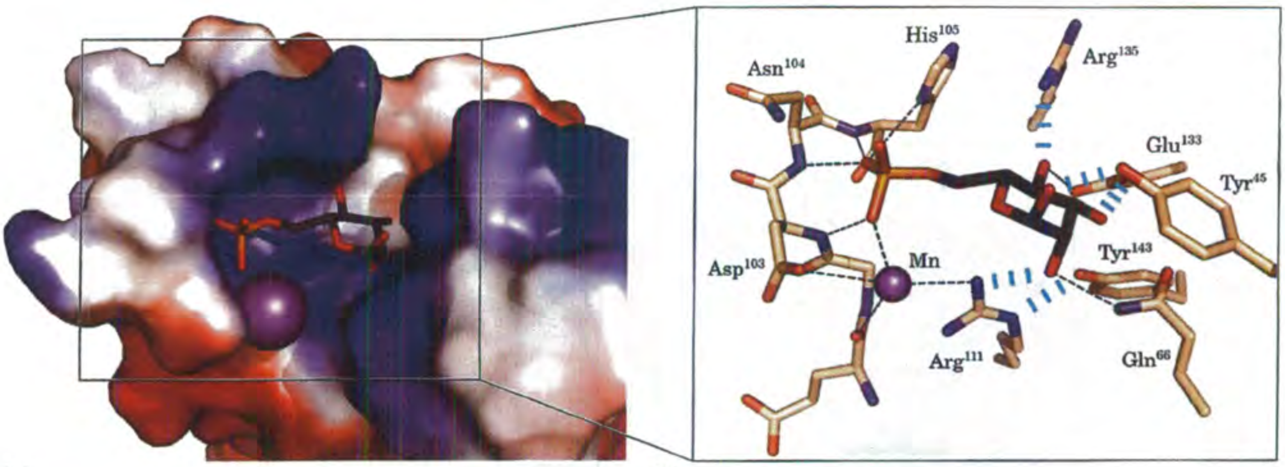


FIGURA 7–33 La interacción lectina-glúcido en detalle. Estructura del receptor bovino de manosa 6-fosfato en el complejo con manosa 6-fosfato (PDB ID 1M6P). Se muestra una imagen de contorno superficial de la proteína, mostrando la superficie como predominantemente negativa (rojo) o cargada positivamente (azul). La manosa 6-fosfato se representa como una estructura de varillas; se muestra un ión manganeso en violeta. **(b)** Vista ampliada del sitio de unión. La manosa 6-fosfato forma un puente de hidrógeno con la Arg^{111} y está coordinada con el ión manganeso (que se muestra más pequeño que su radio de van der Waals por razones de claridad). Cada grupo hidroxilo de la manosa forma puente de hidrógeno con la proteína. La His^{105}, que forma un puente de hidrógeno con un oxígeno del fosfato de la manosa 6-fosfato, puede ser el residuo que cuando se protona a pH bajo provoca la liberación de la manosa 6-fosfato por el receptor al interior del lisosoma.

proteína CD8 de la Figura 4–21), por lo que estas proteínas se denominan **siglecs** (*s*ialic acid recognizing *Ig*-superfamily *lec*tins) 1 a 11, ocasionalmente **sialoadhesinas.** En la interacción de una siglec con ácido siálico (Neu5Ac) intervienen todos los sustituyentes del anillo propios de Neu5Ac: el grupo acetilo en C-5 establece a la vez un puente de hidrógeno e interacciones de van der Waals con la proteína; el grupo carboxilo establece un puente salino con un residuo de Arg conservado, y los hidroxilos del glicerol forman puentes de hidrógeno con la proteína. Las siglecs regulan actividades en los sistemas inmune y nervioso y en el desarrollo de las células sanguíneas. La siglec-7, por ejemplo, al unirse a un gangliósido específico (GD3) que contiene dos residuos de ácido siálico, suprime la actividad de las células citotóxicas (NK, natural killer) del sistema inmune, evitando que células marcadas para la destrucción inmunológica sufran la actividad citotóxica de las NK. Las elevadas concentraciones de GD3 en tumores tales como el melanoma maligno y el neuroblastoma puede ser un mecanismo para evadirse de la acción protectora del sistema inmunitario.

La estructura del receptor de la manosa 6-fosfato/lectina ha revelado detalles de su interacción con la manosa 6-fosfato que explican la especificidad de la unión y el papel de un catión divalente en la interacción lectina–azúcar (Fig. 7–33a). La His^{105} forma un puente de hidrógeno con uno de los átomos de oxígeno del fosfato (Fig. 7–33b). Cuando la proteína marcada con manosa 6-fosfato alcanza el lisosoma (que tiene un pH interno inferior al del complejo de Golgi), el receptor pierde afinidad por la manosa 6-fosfato. La protonación de la His^{105} puede ser responsable de este cambio de afinidad.

Además de estas interacciones tan específicas, hay interacciones más generales que contribuyen a la unión de muchos glúcidos a las lectinas. Por ejemplo, muchos azúcares tienen un lado más polar y otro menos polar (**Fig. 7–34**); el lado más polar forma puentes de hidrógeno con la lectina, mientras que el menos polar establece interacciones hidrofóbicas con residuos aminoácidos apolares. La suma de todas estas interacciones hace que la unión entre las lectinas y los glúcidos sea de gran afinidad y especificidad. Ello representa un tipo de transferencia de información esencial en muchos procesos intercelulares e intracelulares. La **Figura 7–35** resume algunas de las interacciones biológicas en las que interviene el código de los azúcares.

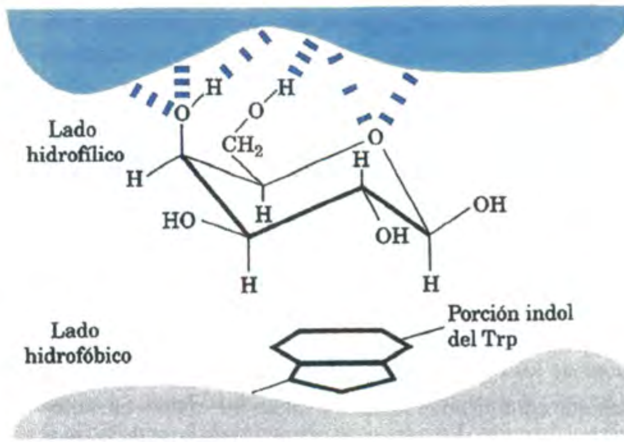


FIGURA 7–34 Interacciones hidrofóbicas de los residuos de azúcar. Las unidades de azúcar tales como la galactosa tienen un lado más polar (la parte superior de la silla tal como se muestra aquí, con el oxígeno del anillo y varios hidroxilos), que está disponible para formar puentes de hidrógeno con la lectina, y un lado menos polar que puede establecer interacciones hidrofóbicas con cadenas laterales apolares de la proteína, tales como el anillo indol de residuos Trp.

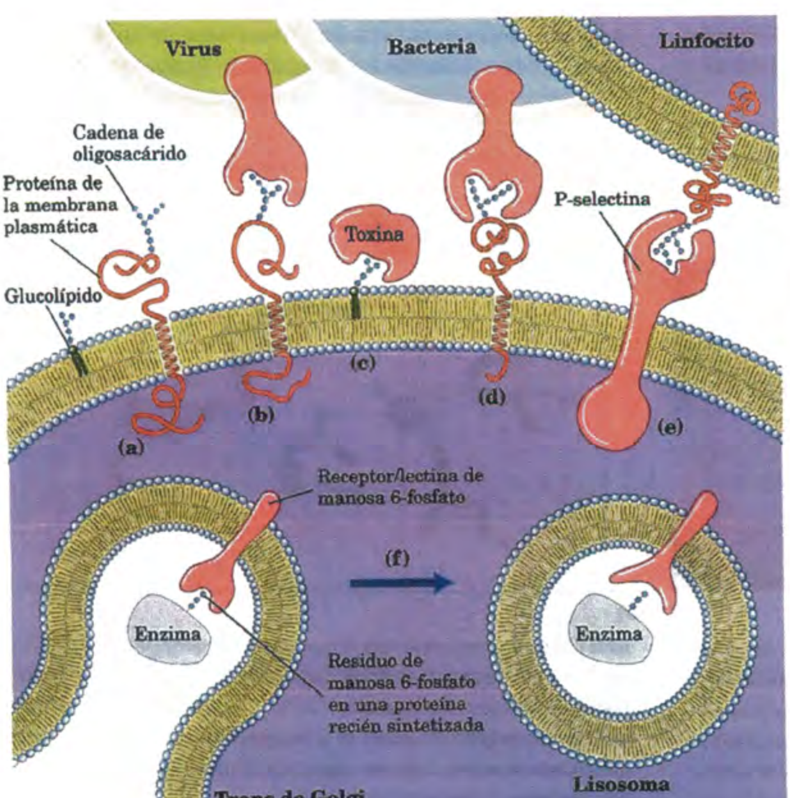


FIGURA 7–35 Papel de los oligosacáridos en el reconocimiento y la adhesión a la superficie celular. (a) Oligosacáridos con estructura única (representados como ristras de hexágonos) que forman parte de una gran variedad de glucoproteínas o glucolípidos, localizados en la superficie externa de la membrana plasmática, interaccionan con elevada especificidad y afinidad con lectinas del medio extracelular. **(b)** Los virus que infectan células animales, tales como el virus de la gripe, se unen a glucoproteínas de la superficie celular en el primer paso de la infección. **(c)** Las toxinas bacterianas, tales como las toxinas del cólera y de la tosferina, se unen a glucolípidos de la superficie antes de entrar en una célula. **(d)** Algunas bacterias, tales como *Helicobacter pylori*, se adhieren a las células animales para después colonizarlas o infectarlas. **(e)** Las selectinas (lectinas) de la membrana plasmática de ciertas células intervienen en las interacciones intercelulares, tal como ocurre con los neutrófilos y las células endoteliales de la pared capilar en un sitio de infección. **(f)** El receptor/lectina de la manosa 6-fosfato del complejo trans de Golgi se une a los oligosacáridos de enzimas lisosómicos, destinándolos a los lisosomas.

RESUMEN 7.4 Los glúcidos son moléculas que contienen información: el código de los azúcares

- Los monosacáridos pueden sintetizarse en una serie prácticamente ilimitada de oligosacáridos, que difieren en estereoquímica y posición de los enlaces glucosídicos, tipo y orientación de los grupos sustituyentes y número y tipo de ramificaciones. Los glucanos contienen una densidad de información mucho mayor que los ácidos nucleicos y las proteínas.
- Las lectinas, proteínas con dominios de unión de glúcidos de gran especificidad, se encuentran comúnmente en la superficie exterior de las células, donde inician la interacción con otras células. En los vertebrados, los oligosacáridos, "interpretados" como señales por las lectinas, gobiernan la velocidad de degradación de ciertas hormonas peptídicas, proteínas circulantes y células sanguíneas.
- La adhesión de patógenos víricos y bacterianos, así como de algunos parásitos eucarióticos, a las células animales diana resulta de la unión de lectinas del patógeno con oligosacáridos de la superficie de las células diana.
- Las lectinas intracelulares participan en el destino intracelular de las proteínas a orgánulos específicos o a una ruta secretoria.
- La cristalografía de rayos X de complejos lectina–azúcar muestra la detallada complementariedad de las dos moléculas, lo que explica la fuerza y especificidad de las interacciones entre lectinas y glúcidos.

7.5 Trabajar con glúcidos

La aceptación creciente de la importancia de la estructura de los oligosacáridos en el reconocimiento biológico ha sido el estímulo que ha impulsado el desarrollo de métodos de análisis de la estructura y la estereoquímica de los oligosacáridos complejos. El análisis de oligosacáridos es complicado, pues, a diferencia de los ácidos nucleicos y las proteínas, pueden estar ramificados y unirse con varios enlaces diferentes. La elevada densidad de carga de muchos oligo- y polisacáridos, así como la labilidad de los ésteres sulfato de los glucosaminoglucanos, son dificultades añadidas.

Para polímeros simples y lineales tales como la amilosa, las posiciones de los enlaces glucosídicos se determinan por el método clásico de la metilación exhaustiva: se trata el polisacárido intacto con yoduro de metilo en medio fuertemente básico para convertir todos los hidroxilos libres en éteres metílicos estables en medio ácido. Luego el polisacárido metilado se hidroliza en medio ácido. Los únicos grupos hidroxilo libres presentes en los derivados monosacáridos así producidos son los que estaban implicados en enlaces glucosídicos. Para determinar la secuencia de los residuos de monosacáridos, incluidas las ramas presentes, se utilizan exoglucosidasas de especificidad conocida para eliminar los residuos uno a uno del extremo o extremos no reductores. La especificidad conocida de estas exoglucosidasas a menudo permite deducir la posición y la estereoquímica de los enlaces.

Para el análisis de la porción oligosacárida de las glucoproteínas y glucolípidos se pueden liberar los oligosacáridos mediante enzimas purificados: las glucosidasas que rompen específicamente enlaces *O*- o *N*- de oligosáridos o las lipasas que separan lo grupos lipídicos de cabeza. De manera alternativa, los glucanos *O*-unidos pueden liberarse de las glucoproteínas mediante tratamiento con hidracina.

Las mezclas de glúcidos resultantes se resuelven en sus componentes individuales mediante un gran número de métodos **(Fig. 7–36)** entre los que se encuentran las mismas técnicas utilizadas en la separación de proteínas y aminoácidos: precipitación fraccionada mediante disolventes, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño (véase la Fig. 3-17). Lectinas altamente purificadas, unidas covalentemente a un soporte insoluble, se utilizan habitualmente en la cromatografía de afinidad de glúcidos (véase la Fig. 3-17c).

La hidrólisis de oligosacáridos y polisacáridos en ácidos fuertes proporciona una mezcla de monosacáridos que se pueden separar, identificar y cuantificar por técnicas cromatográficas para obtener la composición global del polímero.

El análisis de oligosacáridos se basa cada vez más en la espectrometría de masas y la espectroscopia de RMN de alta resolución. La espectrometría de masas por desadsorción/ionización por láser facilitada por matriz (MALDI MS) y la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), ambas descritas en el Recuadro 3-2, son fácilmente aplicables a compuestos polares tales como los oligosacáridos. La MALDI MS es un método muy sensible para determinar la masa de un ión molecular (la cadena completa de oligosacárido). La MALDI MS es un método muy sensible que suministra la masa molecular del ión molecular (en este caso la cadena completa de oligosacárido; **Fig. 7–37**). MS/MS revela la masa del ión molecular y de muchos de sus fragmentos, obtenidos normalmente por rotura de los enlaces glucosídicos. El análisis de RMN por sí solo (véase el Recuadro 4–5), especialmente para oligosacáridos de tamaño medio, puede proporcionar mucha información sobre la secuencia, la posición de los enlaces y la configuración del carbono anomérico. Por ejemplo, la estructura del fragmento de heparina mostrado en forma de modelo espacial en la Fig. 7–22 se obtuvo por espectroscopia RMN. Se utilizan procedimientos automatizados e instrumentos comerciales para las determinaciones de rutina de la estructura de los oligosacáridos, pero la secuenciación de los oligosacáridos ramificados unidos por más de un tipo de enlace continúa siendo mucho más difícil que la determinación de las secuencias lineales de proteínas o ácidos nucleicos.

Otra herramienta importante al trabajar con glúcidos es la síntesis química que se ha convertido en medio poderoso para entender las funciones biológicas de los glucosaminoglucanos y oligosacáridos. La química que está en la base de tales síntesis es difícil pero en la actualidad los químicos expertos en glúcidos pueden sintetizar pequeños segmentos de casi cualquier glucosaminoglucano con la estereoquímica correcta, longitud de cadena y patrón de sulfatación, así como oligosacáridos significativamente más complejos que los que se muestran en la Figura 7–29. La síntesis de oligosacáridos en fase sólida se basa en los mismos principios (y tiene las mismas ventajas) que la síntesis de péptidos (véase le Fig. 3–29), pero requiere un conjunto de herramientas propias de la química de glúcidos: grupos de bloqueo y grupos activadores que permitan la sínte-

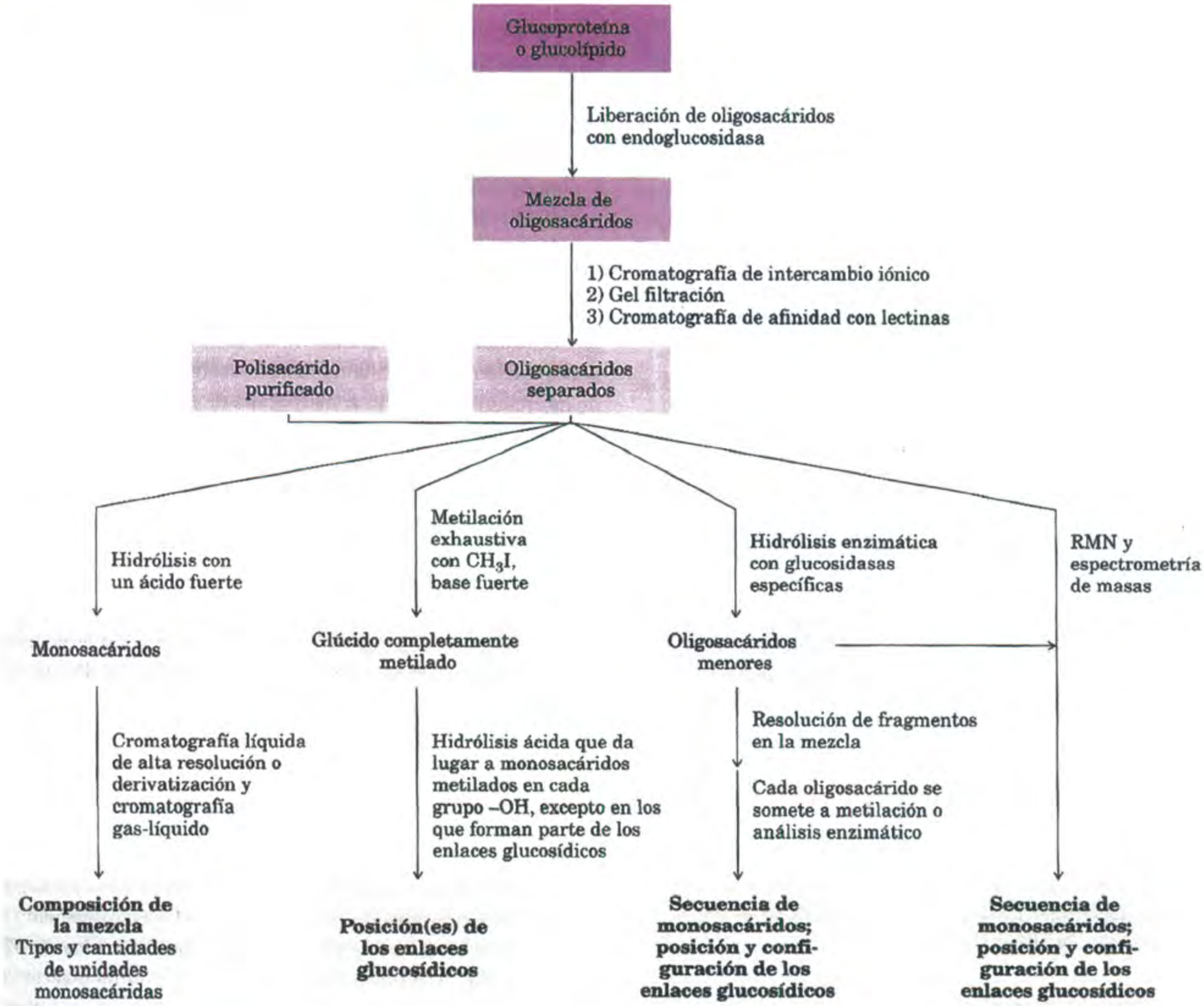


FIGURA 7–36 Métodos de análisis de glúcidos. Un glúcido purificado en el primer paso de su análisis a menudo necesita las cuatro rutas analíticas para su completa caracterización.

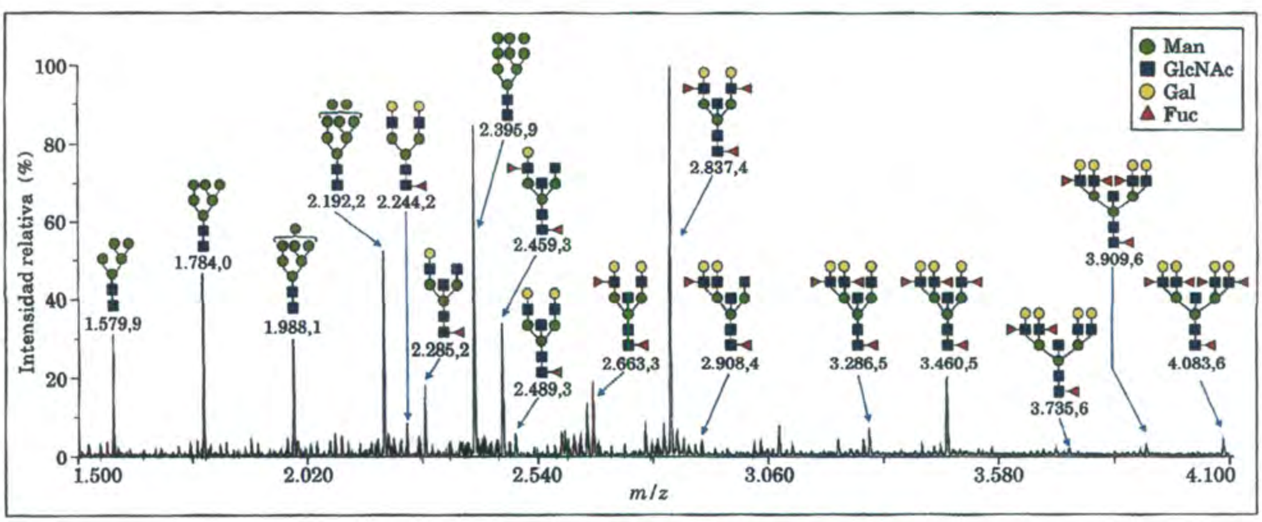


FIGURA 7–37 Separación y cuantificación de los oligosacáridos en un grupo de glucoproteínas. En este experimento se trató la mezcla de proteínas extraídas del tejido renal para liberar oligosacáridos de las glucoproteínas, siendo analizados mediante espectrometría de masas por desadsorción/ionización por láser facilitada por matriz (MALDI MS). Cada oligosacárido concreto produce un pico en su masa molecular mientras que el área debajo de la curva refleja la cantidad de ese oligosacárido. Aquí el oligosacárido más prominente (masa 2.837,4 u) está compuesto por 13 residuos de azúcar; en esta muestra, otros oligosacáridos que van de 7 a 19 residuos también se resuelven con este método.

sis de enlaces glucosídicos con el grupo hidroxilo correcto. Enzimas altamente purificados (glucosiltransferasas) deberían ayudar en la preparación de compuestos sintéticos puros. Enfoques sintéticos como éste son representativos de un área de gran interés en la actualidad, ya que es difícil purificar en cantidades suficientes oligosacáridos definidos a partir de su fuente natural. Microchips de glucanos con una constitución de oligosacáridos definida, análogos a los de DNA descritos en el Capítulo 9, pueden analizarse con lectinas con un marcador fluorescente para determinar su especificidad de unión.

RESUMEN 7.5 Trabajar con glúcidos

- La determinación completa de la estructura de oligosacáridos y polisacáridos requiere establecer la secuencia lineal, las posiciones de ramificación, la configuración de cada unidad de monosacárido y las posiciones de los enlaces glucosídicos, un problema más complejo que el análisis de proteínas y ácidos nucleicos.
- Las estructuras de los oligosacáridos y de los polisacáridos normalmente se determinan por una combinación de métodos: hidrólisis enzimática específica para determinar la estereoquímica y producir fragmentos menores para su posterior análisis; metilación para localizar los enlaces glucosídicos, y una degradación escalonada para determinar la secuencia y la configuración de los carbonos anoméricos.
- La espectrometría de masas y la espectroscopia de RMN de alta resolución, aplicables a pequeñas muestras de glúcidos, suministran información esencial sobre la secuencia, la configuración en los carbonos anoméricos y en otros carbonos y las posiciones de los enlaces glucosídicos.
- Métodos de síntesis en fase sólida proporcionan oligosacáridos definidos que son de gran valor en la exploración de las interacciones lectina–oligosacárido y que podrían ser de utilidad clínica.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

glucoconjugado 235
monosacárido 235
oligosacárido 235
disacárido 235
polisacárido 235
aldosa 236
cetosa 236
fórmulas de proyección de Fischer 236
epímero 238
hemiacetal 238
hemicetal 238
piranosa 239
furanosa 239
anómeros 239
carbono anomérico 239
mutarrotación 239
fórmulas en perspectiva de Haworth 239
azúcar reductor 241
glucación de la hemoglobina 242
enlaces glucosídicos 243
extremo reductor 243
glucano 244
almidón 246
glucógeno 246
matriz extracelular (ECM) 249
glucosaminoglucano 249
hialuronano 250
sulfato de condroitina 250
sulfato de heparán 251
proteoglucano 252
glucoproteína 252
glucolípido 252
sindecán 253
glupicán 253
glucómica 256
lectina 258
selectina 259
siglec 262
sialoadhesina 262

Bibliografía

General

Collins, P.M. & Ferrier, R.J. (1995) *Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
Un texto comprensible de nivel de licenciado.

Lindhorst, T.K (2003) *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2nd edn, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Morrison, R.T. & Boyd, R.N.(1992) *Organic Chemistry*, 6th edn, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
Los capítulos 34 y 35 cubren la estructura, estereoquímica, nomenclatura y reacciones químicas de los glúcidos.

Pérez, S & Mulloy (2005) Prospects for glycoinformatics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 517–524.
Breve introducción a algunos materials muy útiles sobre estructura de glúcidos, síntesis, química y biología en Internet.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., & Marth, J. (eds). (2002) *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
La estructura, la biosíntesis, el metabolismo y la función de los glucosaminoglucanos, los proteoglucanos, las glucoproteínas y los glucolípidos tratados a nivel intermedio y muy bien ilustrado.

Glucosaminoglucanos y proteoglucanos

Bishop, J.R (2007) Heparan sulfate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030–1037.

Bülow , H.E. & Hobert, O. (2006) The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu. Rev. Cell Biol.* **22**, 375–407.
Revisión avanzada de estudios recientes sobre glucosaminoglucanos defectuosos en enfermedades humanas y sobre el uso de organismos modelo para estudiar la biología de los glucosaminoglucanos.

Esko, J.D. & Lindahl, U. (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.* **108**, 169–173.

Esko, J.D. & Selleck, S.B (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 435–471.

Fears, C.Y. & Woods, A. (2006) The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol.* **25**, 443–456.
Revisión a nivel intermedio.

Gama, C.I. & Hsieh-Wilson, L.C. (2005) Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 609–619.
Revisión a nivel intermedio sobre la utilización de glucosaminoglucanos sintetizados químicamente en la investigación de las funciones de estos glucoconjugados.

Häker, U., Nybakken, K., & Perrimon, N. (2005) Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 530–541.
Revisión a nivel intermedio del papel de los proteoglucanos en el desarrollo.

Holt, C.E. & Dickson, B.J. (2005) Sugar codes for axons? *Neuron* **46**, 169–172.
Breve revisión a nivel intermedio sobre el posible papel de los glucosaminoglucanos en la dirección del producto de los axones en el sistema nervioso en desarrollo.

Iozzo, R.V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609–652.

Una revisión de los estudios genéticos y de biología molecular de los proteoglucanos de la matriz. Se discuten en profundidad las relaciones entre estructura y función de algunos proteoglucanos paradigmáticos y se examinan los nuevos aspectos de su biología.

Roseman, S. (2001) Reflections in glycobiology. *J. Biol. Chem.* **276**, 41,527–42,542.

Revisión magistral de la historia de los estudios sobre glúcidos y glucosaminoglucanos por una de las principales figuras de este campo.

Sasisekharan, R., Raman, R., & Prabhakar, V. (2006) Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 181–231.

Revisión avanzada que incluye la metodología del análisis de los glucosaminoglucanos.

Glucoproteínas

Freeze, H.H. & Aebi, M. (2005) Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 490–498.

Breve revisión a nivel intermedio de las consecuencias de los defectos genéticos en la síntesis de glucoproteínas.

Gahmberg, C.G. & Tolvanen, M. (1996) Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 308–311.

Imberty, A., Mitchell, E.P., & Wimmerová, M. (2005) Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 525–534.

Corta revisión a nivel intermedio.

Leroy, J.G. (2006) Congenital disorders of *N*-glycosylation including diseases associated with *O*- as well as *N*-glycosylation defects. *Pediatr. Res.* **60**, 643–656.

Revisión a nivel intermedio de las consecuencias médicas de la glucosilación defectuosa de proteínas.

Mendoncas-Previato, J.O., Todeschini, A.R., Heise, N., & Previato, J.O. (2005) Protozoan parasite-specific structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 499–505.

Breve revisión a nivel intermedio de las estructuras de los oligosacáridos de las glucoproteínas de parásitos.

Varki, A. (2007) Glycan-based interactions involving invertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* **446**, 1023–1029.

Varki, A. & Angata, T. (2006) Siglecs—the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* **16**, 1R–27R.

Revisión a nivel intermedio que incluye tanto estructura como biología.

Weerapana, E. & Imperiali, B. (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* **16**, 91R–101R.

Revisión a nivel intermedio del proceso biosintético de la glucosilación de proteínas.

Glucobiología y el código de los azúcares

Angata, T. & Brinkman-Van der Linden, E. (2002) I-type lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 294–316.

Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., & Davies, G.J. (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382**, 769–781.

Excelente revisión sobre la base structural de la especificidad de las proteínas ligadoras de azúcar.

Borén, T., Normark, S., & Falk, P. (1994) *Helicobacter pylori*: molecular basis of host recognition and bacterial adherence. Trends in microbiol. **2**, 221–228.

De qué modo los oligosacáridos que determinan el grupo sanguíneo afectan la adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica, produciendo úlceras.

Brooks, S., Dwek, M.V., & Schumacher, U. (2002) *Functional and Molecular Glycobiology*, Garland Science, Oxford, UK.

Cornejo, C.J., Winn, R.K., & Harlan, J.M. (1997) Antiadhesion therapy. *Adv. Pharmacol.* **39**, 99–42.

Se utilizan análogos de oligosacáridos de reconocimiento para bloquear la adhesión de un patógeno a su célula huésped diana.

Dahms, N.M. & Hancock, M.K. (2002) P-type lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 317-340.

Fukuda, M. (ed.). (2006) *Functional Glycomics*, Methods in Enzymology, Vol. 417, Academic Press, Inc., New York.

Fukuda, M. (ed.). (2006) *Glycobiology*, Methods in Enzymology, Vol. 415, Academic Press, Inc. New York.

Fukuda, M. (ed.). (2006) *Glycomics*, Methods in Enzymology, Vol. 416, Academic Press, Inc., New York.

Gabius, H.-J. (2000) Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. *Naturwissenschaften* **87**, 108–121.

Descripción de los fundamentos de la elevada densidad de información contenida en los oligosacáridos.

Gabius, H.-J., Andre, S., Kaltner, H., & Siebert, H.C. (2002) The sugar code: functional lectinomics. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 165–177.

Esta revisión examina las razones del relativamente tardío reconocimiento de la información de los oligosacáridos y polisacáridos.

Ghosh, P., Dahms, N.M., & Kornfeld, S. (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 202–212.

Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., Sweeney, M., & Proudfoot, A.E. (2005) Regulation of protein function by glycosaminglycans—as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 385–410.

Herbert, D.N., Garman, S.C., & Molinari, M. (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality control tags. *Trends Cell Biol.* **15**, 364–370.

Revisión a nivel intermedio.

Helenius, A. & Aebi, N. (2004) Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1019–1049.

Hooper, L.A., Manzella, S.M., & Baenziger, J.U. (1996) From legumes to leukocytes: biological roles of sulfated carbohydrates. *FASEB J.* **10**, 1137–1146.

Pruebas del papel de los oligosacáridos sulfatados en la vida media de hormonas peptídicas, en las interacciones simbióticas en las legumbres fijadoras de nitrógeno y en el direccionamiento de los linfocitos.

Iozzo, R.V. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J. Clin. Invest.* **108**, 165–167.

Introducción a una serie de artículos sobre el sulfato de heparán publicados en este ejemplar; todos de provechosa lectura.

Ito, Y., Hagihara, S., Matsuo, I., & Totani, K. (2005) Structural approaches to the study of oligosaccharides in glycoprotein quality control. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 481–489.

Kilpatrick, D.C. (2002) *Animal lectins: a historical introduction and overview. Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 187–197.

Introducción a la serie de excelentes revisiones sobre las lectinas y sus funciones biológicas publicadas en este ejemplar.

Lederkremer, G.Z. & Glickman, M.H. (2005) A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 297–303.

Revisión a nivel intermedio del papel de la glucosilación de proteínas en el control de calidad del retículo endoplasmático.

Lütteke, T., Bohne-Lang, A., Loss, A., Goetz, T., Frank, M., & von der Lieth, C.-W. (2006) Glycosciences.de: an internet portal to support glycomics and glycobiology research. *Glycobiology* **16**, 71R–81R.

McEver, R.P., Moore, K.L. & Cummings, R.D. (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* **270**, 11,025–11,028.

Esta breve revisión incide sobre la interacción de las selectinas con sus ligandos glucídicos.

Reuter, G. & Gabius, H.-J. (1999) Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool? *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 368–422.

Excelente revisión de la diversidad química de oligosacáridos y polisacáridos y de los procesos biológicos dependientes del reconocimiento proteína–glúcido.

Sharon, N. & Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**, 53R–62R.

Excelente introducción a nivel intermedio de la estructura y función de las lectinas.

Taylor, M.E. & Drickamer, K. (2006) *Introduction to Glycobiology*, 2nd edn, Oxford University Press, Oxford.

Weigel, P.H. & Yik, J.H. (2002) Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 341–363.

Trabajar con glúcidos

Chaplin, M.F. & Kennedy, J.F. (eds.) (1994) *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, 2nd edn, IRL Press, Oxford.

Manual muy útil para el análisis de todo tipo de moléculas que contengan azúcares: monosacáridos, polisacáridos, glucosaminoglucanos, glucoproteínas, proteoglucanos y glucolípidos. Accesible como una parte de las Practical Approach Series de IRL Press en CD-ROM de Oxford University Press (www.oup-usa.org/acadsci/pasbooks.html).

Dell, A. & Morris, H.R. (2001) Glycoprotein structure determination by mass spectroscopy. Science **291**, 2351–2356.

Corta revisión sobre los usos de la MALDI MS y la tandem MS en la determinación de la estructura de los oligosacáridos.

Dwek, R.A., Edge, C.J., Harvey, D.J., & Wormald, M.R. (1993) Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 65–100.

Excelente revisión de los usos de la RMN, la espectrometría de masas y los enzimas para determinar la estructura de los oligosacáridos.

Fukuda, M. & Kobata, A. (1993) *Glycobiology: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.

Manual práctico para el aislamiento y la caracterización de la fracción de oligosacárido de las glucoproteínas, utilizando toda la gama de las técnicas modernas disponibles. Accesible como una parte de las Practical Approach Series de IRL Press en CD-ROM de Oxford University Press (www.oup-usa.org/acadsci/pasbooks.html).

Jay, A. (1996) The methylation reaction in carbohydrate analysis. *J. Carbohydr. Chem.* **15**, 897–923.

Lennarz, W.J. & Hart, G.W. (eds) (1994) *Guide to Techniques in Glycobiology*, Methods in Enzymology, Vol 230, Academic Press, Inc., New York.

McCleary, B.V. & Matheson, N.K. (1986) Enzymic analysis of polysaccharide structure. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **44**, 147–276.

Describe el uso de enzimas purificados en el análisis de la estructura y la estereoquímica.

Pulson, J.C., Blixt, O., & Collins, B.E. (2006) Sweetb spots in functional glycomics. *Nature Chem, Biol* **2**, 205–207.

Revisión a nivel intermedio de las herramientas recientemente desarrolladas en glucobiología.

Rudd, P.M., Guile, G.R., Kuester, B., Harvey, D.J., Opdenakker, G., & Dwek, R.A. (1997) Oligosaccharide sequencing technology. *Nature* **388**, 205–207.

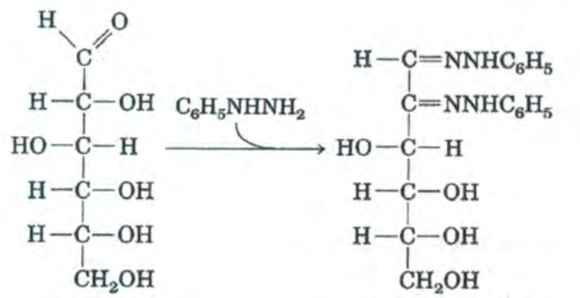
Seeberger, P.H. & Haasee, W. -C. (2000) Solid–Phase oligosacchride synthesis and combinatorial carbohydrate libraries. *Chem. Rev.* **100**, 4349–4393.

Problemas

1. Azúcares alcoholes El oxígeno del grupo carbonilo se reduce dando un grupo hidroxilo en los derivados monosacáridos conocidos como azúcares alcoholes. Por ejemplo, el D-gliceraldehído se puede reducir a glicerol. Sin embargo, este azúcar alcohol ya no se designa como D o L. ¿Por qué?

2. Reconocimiento de epímeros Utilizando la Figura 7-3, identifique los epímeros de (a) D-alosa, (b) D-gulosa y (c) D-ribosa en los carbonos C-2, C-3 y C-4.

3. Los puntos de fusión de los derivados osazona de monosacáridos. Muchos glúcidos reaccionan con la fenilhidracina ($C_6H_5NHNH_2$) para formar derivados cristalinos de color amarillo brillante conocidos como osazonas:



Glucosa — Derivado osazona de glucosa

Las temperaturas de fusión de estos derivados se determinan fácilmente y son características de cada osazona. Esta información se utilizó para ayudar a identificar los monosacáridos antes del desarrollo de la HPLC o de la cromatografía gas-líquido. Debajo hay un listado de los puntos de fusión (P.F.) de algunos derivados aldosa-osazona:

Monosacárido	P. F. del monosacárido anhidro (°C)	P. F. del derivado osazona (°C)
Glucosa	146	205
Manosa	132	205
Galactosa	165–168	201
Talosa	128–130	201

Tal como se muestra en la tabla, ciertos pares de derivados tienen los mismos puntos de fusión, cosa que no ocurre en los monosacáridos no derivados. ¿Por qué la glucosa y la manosa por un lado y, la galactosa y la talosa por otro forman derivados osazona con los mismos puntos de fusión?

4. Interconversión de las formas de la D-glucosa Una disolución de un enantiómero de un monosacárido determinado es capaz de girar el plano de la luz polarizada hacia la izquierda (en sentido contrario a las agujas del reloj) y se denomina isómero levorrotatorio, designado (–); el otro enantiómero produce una rotación de la misma magnitud del plano de la luz polarizada, pero hacia la derecha (en el sentido de las agujas del reloj) y se denomina isómero dextrorrotatorio, designado (+). Una mezcla equimolar de las formas (+) y (–) no produce la rotación en el plano de polarización de la luz.

La actividad óptica de un estereoisómero se expresa cuantitativamente mediante su *rotación óptica*, medida por la rotación en grados del plano de la luz polarizada al pasar a través de una determinada longitud de una disolución del compuesto de una concentración conocida. La *rotación específica* $[\alpha]_\lambda^t$ de un compuesto ópticamente activo se define como:

$$[\alpha]_\lambda^t = \frac{\text{rotación óptica observada (°)}}{\text{longitud del paso óptico (dm)} \times \text{concentración (g/mL)}}$$

En la definición deben especificarse la temperatura (t) y la longitud de onda (λ) de la luz empleada (generalmente la línea D del sodio, 589 nm).

Una disolución recién preparada de α-D-glucosa presenta una rotación específica de +112°. La rotación observada de la disolución decrece gradualmente con el paso del tiempo hasta alcanzar un valor de equilibrio de $[\alpha]_D^{25\,°C} = +52{,}5°$. En cambio, una disolución recién preparada de β-D-glucosa presenta una rotación específica de +19°. La rotación de esta disolución aumenta con el tiempo hasta el mismo valor de equilibrio del anómero α.

(a) Dibuje las fórmulas de perspectiva de Haworth de las formas α y β de la D-glucosa. ¿Cuál es la característica que distingue las dos formas?

(b) ¿Por qué la rotación específica de una disolución recién preparada de la forma α disminuye gradualmente con el tiempo? ¿Por qué disoluciones de las formas α y β evolucionan hasta alcanzar el mismo valor de rotación específica en el equilibrio?

(c) Calcular el porcentaje de cada una de las dos formas de D-glucosa presentes en el equilibrio.

5. Configuración y conformación ¿Qué enlace(s) de la α-D-glucosa debe(n) romperse para cambiar su configuración a β-D-glucosa? ¿Qué enlace(s) para convertir una forma "silla" de la D-glucosa en la otra?

6. Desoxiazúcares ¿Es la D-2-desoxigalactosa el mismo compuesto químico que la D-2-desoxiglucosa? Explíquelo.

7. Estrucuras de azúcares Describa las características estructurales comunes y las diferencias para cada par: (a) celulosa y glucógeno; (b) D-glucosa y D-fructosa; (c) maltosa y sacarosa.

8. Azucares reductores Dibuje la fórmula estructural de la α-D-glucosil-(1→6)-D-manosamina y englobe en un círculo la parte de esta estructura responsable de que el compuesto sea un azúcar reductor.

9. Enlaces hemiacetal y glucosídico Explique las diferencias entre un hemiacetal y un glucósido.

10. Sabor a miel La fructosa de la miel se encuentra principalmente en la forma β-D-piranosa. Éste es uno de los glúcidos más dulces conocidos, unas dos veces más dulce que la glucosa. La forma β-D-furanosa de la fructosa es mucho menos dulce. El dulzor de la miel disminuye gradualmente a elevadas temperaturas. Además, los jarabes de cereales con alto contenido de fructosa (un producto comercial en el cual la mayor parte de la glucosa del jarabe de cereales se transforma en fructosa) se utilizan para endulzar las bebidas *frías*, pero no las *calientes*. ¿Qué propiedad química de la fructosa podría justificar ambas observaciones?

11. Disacárido reductor Un disacárido, que Vd. ya sabe que es o bien maltosa o bien sacarosa, se trata con el reactivo de Fehling y da lugar a una coloración roja. ¿De qué azúcar se trata y cómo lo supo?

12. La glucosa oxidasa en la determinación de la glucosa en sangre El enzima glucosa oxidasa aislado a partir del hongo *Penicillium notatum* cataliza la oxidación de la β-D-glucosa a D-glucono-δ-lactona. Este enzima es altamente específico para el anómero α de la glucosa y no afecta al anómero β. A pesar de esta especificidad, la reacción catalizada por la glucosa oxidasa se usa normalmente en un ensayo clínico de determinación de glucosa total en sangre, en disoluciones que contienen una mezcla de β y α-D-glucosa. ¿Cuáles son las circunstancias que permiten que esto sea posible? Además de permitir la detección de menores cantidades de glucosa, ¿qué ventaja ofrece la glucosa oxidasa sobre el reactivo de Fehling en la determinación de la glucosa en sangre?

13. La invertasa "invierte" la sacarosa La hidrólisis de la sacarosa (rotación específica +66,5°) da lugar a una mezcla equimolar de D-glucosa (rotación específica +52,5°) y D-fructosa (rotación específica –92°). (Véase el Problema 4 sobre los detalles acerca de la rotación específica).

(a) Sugiera un método para determinar la velocidad de hidrólisis de la sacarosa por acción de una preparación enzimática extraída del revestimiento interno del intestino delgado.

(b) Explique por qué la mezcla equimolar de D-glucosa y D-fructosa, resultado de la hidrólisis de la sacarosa, se denomina azúcar invertido en la industria alimentaria.

(c) Se deja que el enzima invertasa (actualmente se prefiere el nombre de sacarasa) actúe sobre una disolución de sacarosa al 10% (0,1 g/mL) hasta que la hidrólisis sea completa. ¿Cuál será la rotación óptica de la disolución en una cubeta de 10 cm? (Ignore la posible pequeña contribución del enzima.)

14. Fabricación de chocolates rellenos La fabricación de chocolates que contienen un relleno líquido es una aplicación interesante de la ingeniería enzimática. El relleno líquido está formado básicamente por una disolución acuosa de azúcares rica en fructosa que endulza su sabor. El dilema técnico es el siguiente: el recubrimiento de chocolate debe prepararse vertiendo chocolate fundido y caliente sobre un núcleo sólido (o casi sólido), y sin embargo el producto final debe tener un relleno líquido, rico en fructosa. Sugiera un modo de solucionar este problema. (Pista: La solubilidad de la sacarosa es mucho menor que la de una mezcla de glucosa y fructosa.)

15. ¿Anómeros de la sacarosa? A pesar de que la lactosa se presenta en dos formas anoméricas, no se han descrito formas anoméricas de la sacarosa. ¿Por qué?

16. Gentiobiosa Gentiobiosa (D-Glc(β1→6)D-Glc) es un disacárido que se encuentra en ciertos glucósidos vegetales. Escriba la estructura de la gentiobiosa basada en su nombre abreviado. ¿Es un azucar reductor? ¿Experimenta mutarrotación?

17. Identificación de azúcares reductores ¿Es un azúcar reductor la *N*-acetil-β-D-glucosamina (Fig. 7-9)? ¿Y el D-gluconato? ¿Es un azúcar reductor el disacárido GlcN(α1↔1α)Glc?

18. Digestión de la celulosa La celulosa podría constituir una forma muy asequible y barata de glucosa, pero los humanos no la pueden digerir. ¿Por qué no? Si se le ofreciese un procedimiento que le permitiese adquirir esta capacidad, ¿lo aceptaría? ¿Por qué sí o por qué no?

19. Propiedades físicas de la celulosa y el glucógeno La celulosa prácticamente pura obtenida a partir de los filamentos de la semilla de las plantas del género *Gossypium* (algodón) es resistente, fibrosa y completamente insoluble en agua. En cambio, el glucógeno obtenido a partir de músculo o hígado se solubiliza fácilmente en agua caliente dando lugar a una disolución turbia. A pesar de que presentan propiedades físicas marcadamente diferentes, ambas sustancias están compuestas por polímeros de D-glucosa, de masa molecular comparable, unidos por enlaces (1→4). ¿Cuáles son las características estructurales que hacen que estos dos polisacáridos difieran en sus propiedades físicas? Explique las ventajas biológicas de sus propiedades respectivas.

20. Dimensiones de un polisacárido Compare las dimensiones de una molécula de celulosa y una molécula de amilasa, cada una con M_r 200.000.

21. Velocidad de crecimiento del bambú Las cañas de bambú, una planta tropical, pueden crecer a la asombrosa velocidad de 0,3 m/día en condiciones óptimas. Debido a que las cañas se componen casi totalmente de fibras de celulosa orientadas en la

dirección del crecimiento, calcule el número de residuos de azúcar por segundo que deben añadirse enzimáticamente a las cadenas de celulosa para justificar esta velocidad de crecimiento. Cada unidad de D-glucosa tiene una longitud aproximada de 0,5 nm una vez incorporada a la molécula de celulosa.

22. El glucógeno como material de reserva energética: ¿Durante cuánto tiempo es capaz de volar un ave de caza? Desde hace mucho tiempo, se ha observado que ciertas aves de caza tales como el urogallo, la codorniz y los faisanes se fatigan fácilmente. El historiador griego Jenofonte escribió: "Las avutardas (...) pueden ser capturadas si se las levanta con rapidez, puesto que son capaces de volar tan sólo una corta distancia y se cansan enseguida, lo mismo que las perdices; y su carne es deliciosa". Los músculos de las alas de las aves de caza dependen casi exclusivamente de la utilización de glucosa 1-fosfato como fuente de energía, en forma de ATP (Capítulo 14). La glucosa 1-fosfato se forma por degradación del glucógeno almacenado en el músculo, catalizada por el enzima glucógeno fosforilasa. La velocidad de producción de ATP está limitada por la velocidad de degradación del glucógeno. Durante un "vuelo súbito", la velocidad de degradación del glucógeno en las aves de caza es bastante elevada, aproximadamente 120 μmol/min de glucosa 1-fosfato producida por gramo de tejido fresco. Considerando que los músculos de las alas generalmente contienen un 0,35% de glucógeno en peso, calcule durante cuánto tiempo puede volar un ave de caza. (Suponga una masa molecular media para un residuo de glucosa en el glucógeno de 162 g/mol).

23. Estabilidad relativa de dos confórmeros Explique por qué las dos estructuras que se muestran en la Figura 7-19 son tan diferentes energéticamente (estabilidad). (Pista: Véase la Figura 1-21).

24. Volumen de sulfato de condroitina en disolución Una de las funciones más importantes del sulfato de condroitina es actuar como lubricante en las articulaciones óseas formando un medio parecido a un gel, capaz de resistir la fricción y los impactos. Esta función parece estar relacionada con una propiedad característica del sulfato de condroitina: el volumen ocupado por la molécula es mucho mayor en disolución que cuando forma un sólido deshidratado. ¿Por qué el volumen ocupado por la molécula es mucho mayor en disolución?

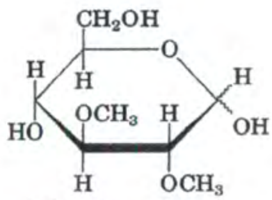
25. Interacciones de la heparina La heparina es un glucosaminoglucano cargado muy negativamente, que se utiliza clínicamente como anticoagulante. Actúa uniéndose a varias proteínas del plasma, incluida la antitrombina III que es un inhibidor de la coagulación sanguínea. La unión 1:1 de la heparina a la antitrombina III provoca un cambio conformacional en la proteína que incrementa mucho su capacidad para inhibir la coagulación. ¿Qué aminoácidos de la antitrombina III es probable que interaccionen con la heparina?

26. Permutaciones de un trisacárido Piense sobre cómo se podría calcular el número de trisacáridos posibles constituidos por *N*-acetilglucosamina 4-sulfato (GlcNAc4S) y ácido glucurónico (ALCA), y escriba 10 de ellos.

27. Efecto del ácido siálico sobre la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS Suponga que tiene cuatro formas de una proteína, todas ellas con secuencia de aminoácidos idéntica pero que contengan cero, uno, dos o tres cadenas oligosacáridas que terminan, cada una de ellas en un residuo de ácido siálico. Dibuje el patrón del gel esperado cuando se somete una mezcla de estas cuatro glucoproteínas a electroforesis sobre gel de poliacrilamida en presencia de SDS (véase la Fig. 3-18) y se tiñen con un reactivo de proteína. Identifique las bandas en su dibujo.

28. Contenido informativo de los oligosacáridos La porción de glúcido de algunas glucoproteínas puede servir de sitio de reconocimiento celular. Para ello, es necesario que los oligosacáridos de las glucoproteínas puedan adoptar una amplia variedad de formas. ¿Qué compuestos podrían dar lugar a una mayor variedad de estructuras: los oligopéptidos compuestos por cinco aminoácidos diferentes o los oligosacáridos compuestos por cinco monosacáridos diferentes? Justifique su respuesta.

29. Determinación del grado de ramificación de la amilopectina El grado de ramificación de la amilopectina (número de enlaces glucosídicos (α1→6) se puede determinar mediante el siguiente procedimiento. Una muestra de amilopectina es tratada exhaustivamente con un agente metilante (yoduro de metilo) que reemplaza todos los hidrógenos de los grupos hidroxilo del azúcar por grupos metilo, convirtiendo los grupos —OH en grupos —OCH_3. Todos los enlaces glucosídicos de la muestra tratada se hidrolizan a continuación en una disolución acuosa ácida. Se determina la cantidad de 2,3-di-*O*-metilglucosa en la muestra hidrolizada.



2,3-Di-*O*-metilglucosa

(a) Explique en qué se basa el método de determinación del número de puntos de ramificación (α1→6) de la amilopectina. ¿Qué sucede con los residuos de glucosa no ramificados de la amilopectina durante los procesos de metilación e hidrólisis?

(b) Una muestra de amilopectina de 258 mg tratada del modo descrito anteriormente dio un rendimiento de 12,4 mg de 2,3-di-*O*-metilglucosa. Determine cuál es el porcentaje de residuos de glucosa que contienen un enlace de ramificación (α1→6). (Considere que la masa molecular de un residuo de glucosa en la amilopectina es 162 g/mol.)

30. Análisis estructural de un polisacárido Se aisló un polisacárido de estructura desconocida y se sometió a un proceso de metilación exhaustiva y posterior hidrólisis. El análisis de los productos reveló la presencia de tres azúcares metilados: 2,3,4-tri-*O*-metil-D-glucosa, 2,4-di-*O*-metil-D-glucosa y 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glucosa en una relación 20:1:1. ¿Cuál es la estructura del polisacárido?

Problema de análisis de datos

31. Determinación de la estructura de los antígenos del grupo sanguíneo ABO El sistema del grupo sanguíneo ABO humano se descubrió en 1901 y, en 1924, se demostró que este rasgo se heredaba en forma de un locus génico simple con tres alelos. En 1960, W.T.J. Morgan publicó un artículo en el que se resumía lo que se conocía en aquel momento sobre la estructura de las moléculas de antígeno ABO. Cuando se publicó el artículo no se conocían aún las estructuras completas de los antígenos A, B y O; este trabajo constituye un ejemplo del aspecto que tiene el conocimiento científico "en su formación".

En todo intento de determinar la estructura de un compuesto biológico desconocido los investigadores se enfrentan a dos problemas fundamentales: (1) si se desconoce lo que *ello* es, ¿cómo saber si *ello* es puro?; (2) si no sabe lo que *ello* es, ¿cómo saber si las condiciones de extracción y purificación no

han cambiado *su* estructura? Morgan enfocó el problema 1 mediante varios métodos. Uno de los métodos descritos en su artículo consiste en observar "valores analíticos constantes después de pruebas de solubilidad fraccional (p. 312). En este caso los "valores analíticos" consisten en medidas de la composición química, punto de fusión y otros.

(a) Basándose en su conocimiento de las técnicas químicas ¿qué significaba para Morgan "pruebas de solubilidad fraccional"?

(b) ¿Por qué los valores analíticos obtenidos de las pruebas de solubilidad fraccional de una sustancia *pura* habían de ser constantes mientras que los de una sustancia *impura* no eran constantes?

Morgan se enfrontó al problema 2 utilizando un ensayo para medir la actividad inmunológica de la sustancia presente en diferentes muestras.

(c) ¿Por qué fue tan importante en los estudios de Morgan, especialmente en referencia al problema 2, que esta prueba de actividad fuese cuantitativa (medición del nivel de actividad) y no simplemente cualitativa (medir sólo la presencia o ausencia de una sustancia?

La estructura de los antígenos de grupo sanguíneo se muestra en la Figura 10-15. En su artículo (p. 314), Morgan señaló varias propiedades de los tres antígenos A, B y O que se conocían en aquel momento:

1. El antígeno tipo B tiene un mayor contenido en galactosa que el A o el O.
2. El antígeno del tipo A contiene más aminoazúcares que el B o el O.
3. La razón glucosamina/galactosamina del antígeno A es aproximadamente de 1,2 mientras que para el B es aproximadamente 2,5.

(d) ¿Cuál(es) de estos hallazgos es(son) consistente(s) con las estructuras conocidas de los antígenos de grupo sanguíneo?

(e) ¿Cómo explica las discrepancias entre los datos de Morgan y las estructuras conocidas?

En trabajos posteriores, Morgan y sus colegas utilizaron una técnica ingeniosa para obtener información estructural acerca de los antígenos de grupo sanguíneo. Se habían encontrado enzimas que degradaban específicamente los antígenos. Sin embargo, estos enzimas sólo se podían obtener en forma de preparaciones enzimáticas crudas que quizás contenían más de un enzima de especificidad desconocida. La degradación de los antígenos de tipo sanguíneo por estos enzimas se podía inhibir mediante la adición de moléculas de azúcares particulares a la reacción. Sólo los azúcares encontrados en los antígenos de tipo sanguíneo podían producir la inhibición. Una preparación enzimática, aislada del protozoo *Trichomonas foetus*, degradaba los tres antígenos y era inhibido por la adición de ciertos azúcares. Los resultados de estos estudios se resumen en la tabla siguiente, en la que se muestra el porcentaje de sustrato que permanecía intacto cuando el enzima de *T. foetus* actuaba sobre los antígenos de grupo sanguíneo en presencia de azúcares.

	Sustrato sin reaccionar (%)		
Azúcar añadido	**Antígeno A**	**Antígeno B**	**Antígeno O**
Control (sin azúcar)	3	1	1
L-Fucosa	3	1	100
D-Fucosa	3	1	1
L-Galactosa	3	1	3
D-Galactosa	6	100	1
N-Acetilglucosamina	3	1	1
N-Acetilgalactosamina	100	6	1

En el caso del antígeno O, la comparación entre el control y la L-fucosa muestra que la L-fucosa inhibe la degradación del antígeno. Constituye un ejemplo de inhibición por producto, en el que un exceso del producto de la reacción desplaza el equilibrio impidiendo que continúe la degradación del sustrato.

(f) Aunque el antígeno O contiene galactosa, *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilgalactosamina, ninguno de estos azúcares inhibió la degradación de este antígeno. Basándose en estos datos, la preparación enzimática de *T. foetus* ¿es una endo- o exoglucosidasa? (las endoglucosidasas rompen enlaces entre residuos del interior; las exoglucosidasas eliminan residuos uno a uno del extremo de un polímero). Explique su razonamiento.

(g) La fucosa también está presente en los antígenos A y B. Basándose en la estruturas de estos antígenos ¿por qué la fucosa no puede impedir su degradación por el enzima de *T. foetus*? ¿Qué estructura se produciría?

(h) ¿Qué resultados en (f) y (g) están de acuerdo con las estructuras mostradas en la Figura 10-15? Explíquelo.

Referencia

Morgan (1960) The Croonian lecture: a contribution to human biochemical genetics; the chemical basis of blood-groun specifity. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **151**, 308–347.

> *Una estructura tan hermosa tenía que existir.*
>
> —*James Watson,* The Double Helix, *1968*

8

Nucleótidos y ácidos nucleicos

Los nucleótidos desempeñan una amplia variedad de funciones en el metabolismo celular. Constituyen la moneda energética en las transacciones metabólicas, son los nexos químicos en los sistemas celulares, en respuesta a hormonas y otros estímulos extracelulares, y son también componentes estructurales de una serie de cofactores enzimáticos e intermedios metabólicos. Por último, pero no por ello menos importante, son los constituyentes de los ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA), los depositarios moleculares de la información genética. La estructura de todas las proteínas, y en último término de todas las biomoléculas y de cada uno de los componentes celulares, es producto de la información programada en la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos de la célula. La capacidad de almacenar y transmitir información genética sobre la naturaleza química de una generación a la siguiente es el requisito básico de la vida.

Este capítulo ofrece una visión general sobre la naturaleza química de los nucleótidos; en la Parte III examinaremos más detalladamente la función de los ácidos nucleicos.

8.1 Conceptos básicos

Los nucleótidos, constituyentes básicos de los ácidos nucleicos En el DNA se encuentran especificadas las secuencias de aminoácidos de todas las proteínas y las secuencias de nucleótidos de todas las moléculas de RNA. Un segmento de DNA que contenga la información necesaria para la síntesis de un producto biológico funcional, proteína o RNA, recibe el nombre de **gen.** Una célula ordinaria tiene muchos miles de genes y, por tanto, no resulta sorprendente que las moléculas de DNA suelan ser muy largas. Las únicas funciones conocidas del DNA son el almacenamiento y la transmisión de la información biológica.

En la célula se encuentran varias clases de RNA, que cubren una más amplia variedad de funciones. Los **RNA ribosómicos (rRNA)** son componentes de los ribosomas, complejos que llevan a cabo la síntesis de proteínas. Los **RNA mensajeros (mRNA)** actúan de intermediarios, transportando la información desde un gen o unos pocos genes hasta el ribosoma, donde se sintetizan las proteínas. Los **RNA de transferencia (tRNA)** son moléculas adaptadoras que traducen con fidelidad la información contenida en el mRNA a secuencias específicas de aminoácidos. Además de estas clases principales, existe una amplia variedad de RNA que desempeñan funciones específicas, que se describen en profundidad en la Parte III.

Los nucleótidos y los ácidos nucleicos están formados por bases y pentosas características

Los **nucleótidos** están formados por tres componentes característicos: (1) una base nitrogenada, (2) una pentosa y (3) un fosfato **(Fig. 8–1)**. La molécula sin el grupo fosfato se deno-

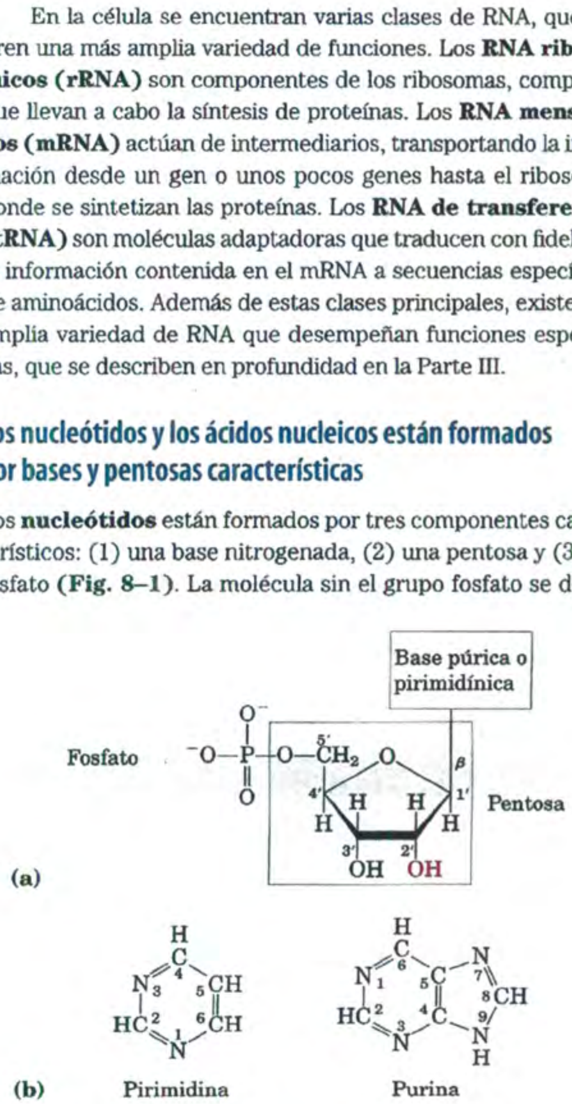


FIGURA 8–1 Estructura de los nucleótidos. **(a)** Estructura general de los nucleótidos con la numeración convencional del anillo de la pentosa. Se muestra la estructura de un ribonucleótido. En los desoxirribonucleótidos un —H reemplaza al grupo —OH del carbono 2′ (en rojo). **(b)** Los compuestos parentales de los que derivan las bases purínicas y pirimidínicas de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos, con especificación de las convenciones para la numeración.

mina **nucleósido.** Las bases nitrogenadas son derivados de dos compuestos parentales, **pirimidina y purina.** Las bases y las pentosas de los nucleótidos comunes son compuestos heterocíclicos.

CONVENCIÓN CLAVE: Los átomos de carbono y de nitrógeno de las estructuras parentales se numeran de modo convencional con el fin de facilitar la nomenclatura y la identificación de sus muchos derivados. Las convenciones adoptadas para los anillos de pentosa siguen las reglas descritas en el Capítulo 7, pero a los números de los átomos de carbono de las pentosas de los nucleótidos y nucleósidos se les añade el signo prima (′) para distinguirlos de los átomos numerados de las bases nitrogenadas. ■

La base de un nucleótido está unida covalentemente (por el N-1 en las pirimidinas y el N-9 en las purinas) a través de un enlace *N*-β-glucosídico con el carbono 1′ de la pentosa, y el fosfato está esterificado con el carbono 5′. El enlace *N*-β-glucosídico se forma por eliminación de agua (un grupo hidroxilo de la pentosa y un hidrógeno de la base), como en la formación de los enlaces *O*-glucosídicos (véase la Fig. 7–29).

Tanto el DNA como el RNA contienen dos bases purínicas principales, la **adenina** (A) y la **guanina** (G), y dos pirimidinas principales. Tanto en el DNA como en el RNA ua de las pirimidinas es la **citosina** (C) pero la segunda base pirimidínica no es la misma en los dos es **timina** (T) en el DNA y **uracilo** (U) en el RNA. Sólo raramente se encuentre timina en el RNA o uracilo en el DNA. En la **Figura 8–2** se muestran las estructuras de las cinco bases principales y en la Tabla 8–1 se resume la nomenclatura de sus correspondientes nucleótidos y nucleósidos.

Los ácidos nucleicos contienen dos tipos de pentosas. Los desoxirribonucleótidos del DNA contienen 2′-desoxi-D-ribosa, y los ribonucleótidos del RNA contienen D-ribosa. En los nucleótidos, ambos tipos de pentosa se encuentran en la forma β-furanosa (anillo pentagonal cerrado). Tal como muestra la **Figura 8–3**, el anillo de la pentosa no es plano, sino que presenta diversas conformaciones distorsionadas, designadas generalmente como formas "ahuecadas".

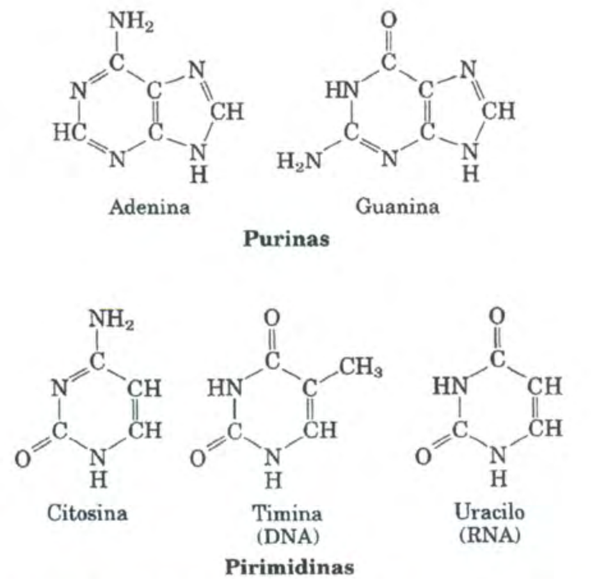


FIGURA 8–2 Principales bases purínicas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos. Algunos de los nombres comunes de estos compuestos reflejan las circunstancias de su descubrimiento. La guanina, por ejemplo, se aisló por vez primera del guano (estiércol de aves) y la timina se aisló por primera vez de tejido del timo.

CONVENCIÓN CLAVE: Aunque son dos los aspectos que distinguen el DNA del RNA —diferentes pentosas y la presencia de uracilo en el RNA y de timina en el DNA— son las pentosas las que definen la identidad de un ácido nucleico. Si el ácido nucleico contiene 2′-desoxi-D-ribosa es DNA por definición aunque pueda contener unos cuantos uracilos. Del mismo modo, si el ácido nucleico contiene D-ribosa, es RNA con independencia de su composición en bases. ■

TABLA 8–1 Nomenclatura de los nucleótidos y los ácidos nucleicos

Base	Nucleósido	Nucleótido	Ácido nucleico
Purinas			
Adenina	Adenosina	Adenilato	RNA
	Desoxiadenosina	Desoxiadenilato	DNA
Guanina	Guanosina	Guanilato	RNA
	Desoxiguanosina	Desoxiguanilato	DNA
Pirimidinas			
Citosina	Citidina	Citidilato	RNA
	Desoxicitidina	Desoxicitidilato	DNA
Timina	Timidina o desoxitimidina	Timidilato o desoxitimidilato	DNA
Uracilo	Uridina	Uridilato	RNA

Nota: "Nucleósido" y "nucleótido" son términos genéricos que incluyen tanto las formas ribo- como las desoxirribo-. Tanto los ribonucleósidos como los ribonucleótidos se designan aquí simplemente como nucleósidos y nucleótidos (p.ej., la riboadenosina se denomina adenosina) y los desoxirribonucleósidos y desoxirribonucleótidos como desoxinucleósidos y desoxinucleótidos (por ejemplo la desoxirriboadenosina se denomina desoxiadenosina). Ambas nomenclaturas son aceptables, pero se utilizan más comúnmente las denominaciones más cortas. La timina es una excepción; se utiliza el nombre "ribotimidina" para poner de manifiesto su presencia poco habitual en el RNA.

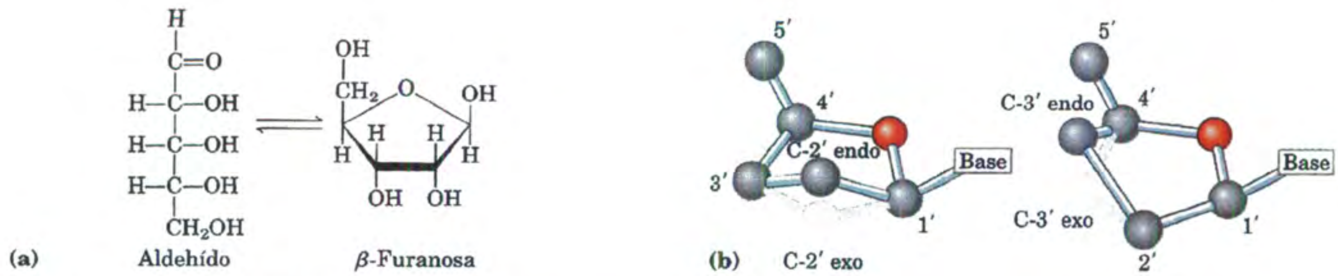
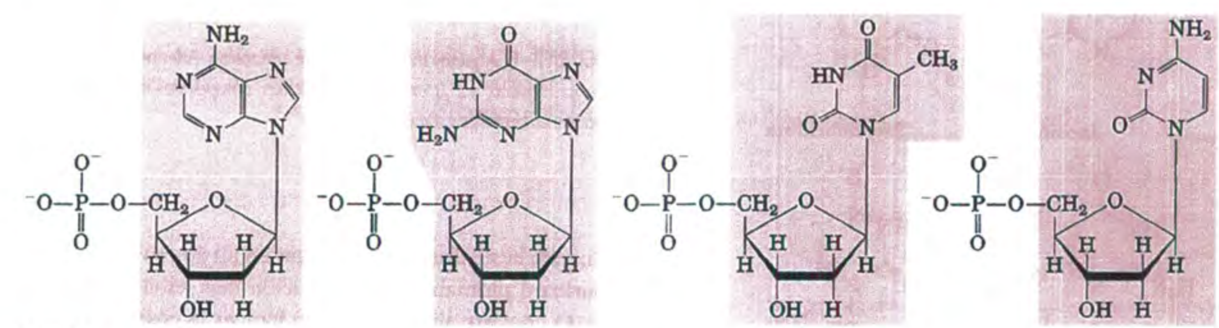


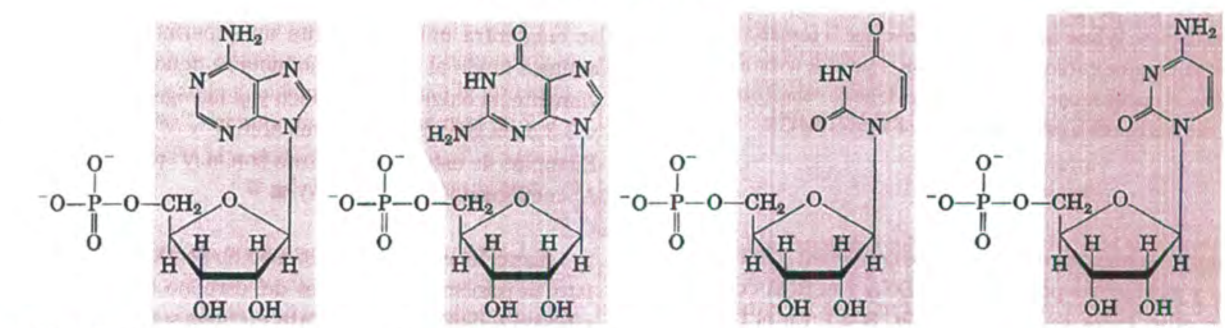
FIGURA 8–3 Conformaciones de la ribosa. (a) En disolución, las formas lineal (aldehído) y cíclica (β-furanosa) de la ribosa están en equilibrio. El RNA contiene únicamente la forma cíclica, β-D-ribofuranosa. La desoxirribosa sufre una interconversión similar en disolución, pero en el DNA sólo se encuentra como β-2′-desoxi-D-ribofuranosa. (b) Los anillos de ribofuranosa pueden existir en cuatro conformaciones distintas. En todos los casos, cuatro de los cinco átomos están contenidos en un solo plano. El quinto átomo (C-2′ o C-3′) se encuentra en el mismo lado (endo) o en el lado opuesto (exo) del plano que el átomo C-5′.

En la **Figura 8–4** se muestran las estructuras y los nombres de los cuatro **desoxirribonucleótidos** principales (desoxirribonucleósidos 5′-monofosfato), las unidades estructurales del DNA, y los cuatro **ribonucleótidos** principales (ribonucleósidos 5′-monofosfato), las unidades estructurales de los RNA.



Nucleótido:	Desoxiadenilato (desoxiadenosina 5′-monofosfato)	Desoxiguanilato (desoxiguanosina 5′-monofosfato)	Desoxitimidilato (desoxitimidina 5′-monofosfato)	Desoxicitidilato (desoxicitidina 5′-monofosfato)
Símbolos:	A, dA, dAMP	G, dG, dGMP	T, dT, dTMP	C, dC, dCMP
Nucleósido:	Desoxiadenosina	Desoxiguanosina	Desoxitimidina	Desoxicitidina

(a) Desoxirribonucleótidos



Nucleótido:	Adenilato (adenosina 5′-monofosfato)	Guanilato (guanosina 5′-monofosfato)	Uridilato (uridina 5′-monofosfato)	Citidilato (citidina 5′-monofosfato)
Símbolos:	A, AMP	G, GMP	U, UMP	C, CMP
Nucleósido:	Adenosina	Guanosina	Uridina	Citidina

(b) Ribonucleótidos

FIGURA 8–4 Desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos de los ácidos nucleicos. Todos los nucleótidos se muestran en su forma libre a pH 7,0. Las unidades nucleotídicas del DNA (a) suelen simbolizarse por A, G, T y C, y en ocasiones por dA, dG, dT y dC; las del RNA (b) por A, G, U y C. En su forma libre, los desoxirribonucleótidos se suelen abreviar como dAMP, dGMP, dTMP y dCMP, y los ribonucleótidos, como AMP, GMP, UMP y CMP. En cada nucleótido, el nombre más común va seguido por el nombre completo entre paréntesis. Todas las abreviaturas suponen que el grupo fosfato se encuentra en posición 5′. La parte nucleosídica de cada molécula está sombreada de rosa. En esta ilustración y en las siguientes no se muestran los carbonos del anillo.

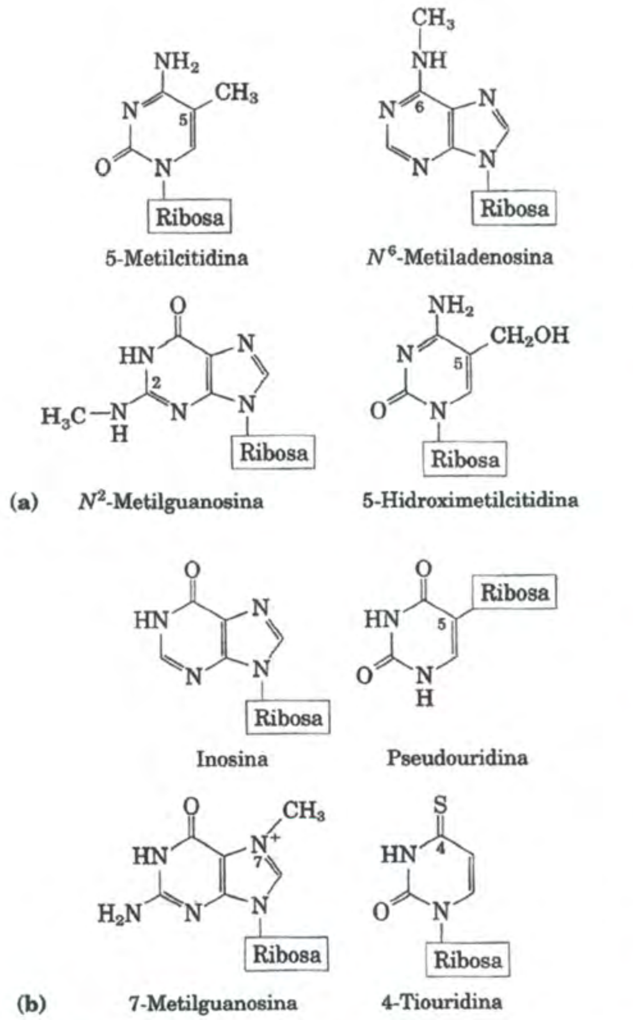


FIGURA 8–5 Algunas bases purínicas y pirimidínicas minoritarias en su forma nucleosídica. (a) Bases poco abundantes en el DNA. La 5-metilcitidina está presente en el DNA de los animales y plantas superiores, la N^6-metiladenosina en el DNA bacteriano y la 5-hidroximetilcitidina en las bacterias infectadas por diversos bacteriófagos. (b) Algunas bases poco abundantes presentes en los tRNA. La inosina contiene la base hipoxantina. Observe que la pseudouridina, como la uridina, contiene uracilo; se distinguen por el punto de unión a la ribosa: en la uridina, el uracilo se une por N-1, el punto de unión normal para las pirimidinas, mientras que en la pseudouridina se une a través del C-5.

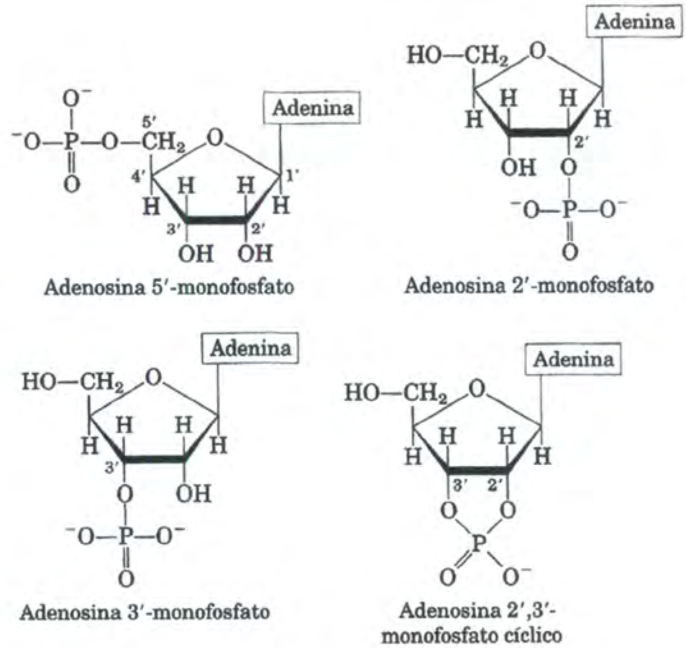


FIGURA 8–6 Algunos monofosfatos de adenosina. Adenosina 2′-monofosfato, 3′-monofosfato, y 2′,3′-monofosfato cíclico, compuestos intermedios de la hidrólisis enzimática y alcalina del RNA.

Aunque la mayoría de nucleótidos contienen solamente las purinas y pirimidinas principales, el DNA y el RNA contienen también otras bases secundarias **(Fig. 8–5)**. En el DNA, las más comunes son las formas metiladas de las bases principales; en algunos DNA víricos, ciertas bases puedan estar hidroximetiladas o glucosiladas. Las bases alteradas o poco comunes del DNA sirven a menudo como señales específicas para la regulación o la protección de la información genética. En el RNA, y en especial en el tRNA, se encuentran también bases minoritarias de muchos tipos (véanse las Figs. 8–25 y 26–23).

CONVENCIÓN CLAVE: La nomenclatura de las bases minoritarias puede resultar confusa. Muchas tienen nombres comunes, al igual que las bases principales, como, por ejemplo, la hipoxantina, cuyo nucleósido, inosina, se muestra en la Figura 8-5. Cuando la sustitución tiene lugar en un átomo de los anillos de purina o pirimidina, la convención más habitual (la utilizada aquí) consiste simplemente en indicar la posición en el anillo donde se ha producido la sustitución: por ejemplo, 5-metilcitosina, 7-metilguanina y 5-hidroximetilcitosina (mostradas en su forma nucleosídica en la Fig. 8–5). El elemento (N, C, O) al cual está unido el sustituyente no está especificado. Las convenciones cambian cuando el átomo sustituido es exocíclico (no incluido en la estructura del anillo), en cuyo caso se identifica el tipo de átomo y se indica la posición del anillo a la que se encuentra unido mediante un superíndice. El nitrógeno amínico unido al C-6 de la adenina se denominará N^6; análogamente, el oxígeno carbonílico y el nitrógeno amínico en C-6 y C-2 de la guanina se denominarán C^6 y N^2, respectivamente. Ejemplos de esta nomenclatura son la N^6-metiladenosina y la N^2-metilguanosina (Fig. 8–5). ■

Las células también contienen nucleótidos con grupos fosfato en posiciones diferentes del carbono 5′ **(Fig. 8–6)**. Los **ribonucleósidos 2′,3′-fosfato cíclicos** son intermedios aislables y los **ribonucleósidos 3′-monofosfato** productos finales de la hidrólisis del RNA por ciertas ribonucleasas. Otros ejemplos son la adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cAMP) y la guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cGMP), que se comentan al final de este capítulo.

Los nucleótidos sucesivos de los ácidos nucleicos están unidos por enlaces fosfodiéster

Los nucleótidos sucesivos del DNA y el RNA están unidos covalentemente mediante "puentes" de grupos fosfato, en los cuales el grupo hidroxilo en 5′ de un nucleótido está unido al grupo hi-

droxilo en 3′ del nucleótido siguiente mediante un **enlace fosfodiéster (Fig. 8–7)**. Por tanto, los esqueletos covalentes de los ácidos nucleicos consisten en residuos alternados de fosfato y pentosa, mientras que las bases pueden considerarse como grupos laterales unidos al esqueleto a intervalos regulares. Los esqueletos covalentes del DNA y el RNA son hidrofílicos. Los grupos hidroxilo de los residuos de azúcar forman enlaces de hidrógeno con el agua. Los grupos fosfato, con un pK_a cercano a 0, se encuentran completamente ionizados y cargados negativamente a pH 7, y las cargas negativas se encuentran generalmente neutralizadas por interacciones iónicas con cargas positivas de proteínas, iones metálicos o poliaminas.

CONVENCIÓN CLAVE: Todos los enlaces fosfodiéster en el DNA y en el RNA tienen la misma orientación a lo largo de la cadena (Fig. 8–7), con lo cual cada cadena lineal de ácido nucleico tiene una polaridad específica y extremos 5′ y 3′ diferenciados. Por definición, el **extremo 5′** carece de nucleótido en posición 5′, mientras que el **extremo 3′** carece de nucleótido en posición 3′. Otros grupos (con frecuencia uno o más grupos fosfato) pueden estar presentes en uno o en ambos extremos. La orientación 5′ a 3′ de una cadena de ácido nucleico se refiere a los *extremos* de la cadena, no a la orientación de los enlaces fosfodiéster individuales que unen los nucleótidos que la forman. ■

El esqueleto covalente del DNA y el RNA experimenta una lenta hidrólisis no enzimática de los enlaces fosfodiéster. Al contrario del DNA, el RNA en el tubo de ensayo se hidroliza rápidamente en condiciones alcalinas; los grupos hidroxilo en 2′ del RNA (ausentes en el DNA) están directamente implicados en el proceso. Los primeros productos de la acción del álcali sobre el RNA son 2′,3′-monofosfatos cíclicos, los cuales son rápidamente hidrolizados para producir una mezcla de 2′- y 3′-nucleósidos monofosfato **(Fig. 8–8)**.

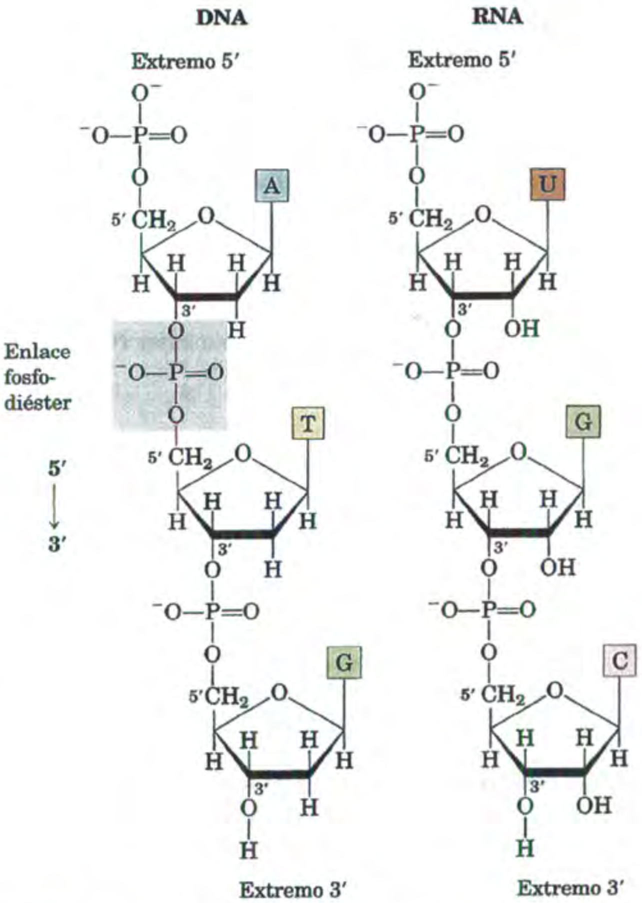


FIGURA 8–7 Enlaces fosfodiéster del esqueleto covalente del DNA y el RNA. Los enlaces fosfodiéster (uno de los cuales está sombreado en el DNA) unen los nucleótidos sucesivos. Las cadenas de azúcar-fosfato alternantes son muy polares en ambos tipos de ácido nucleico. El extremo 5′ de la macromolécula carece de nucleótido en la posición 5′ y el extremo 3′ carece de nucleótido en la posición 3′.

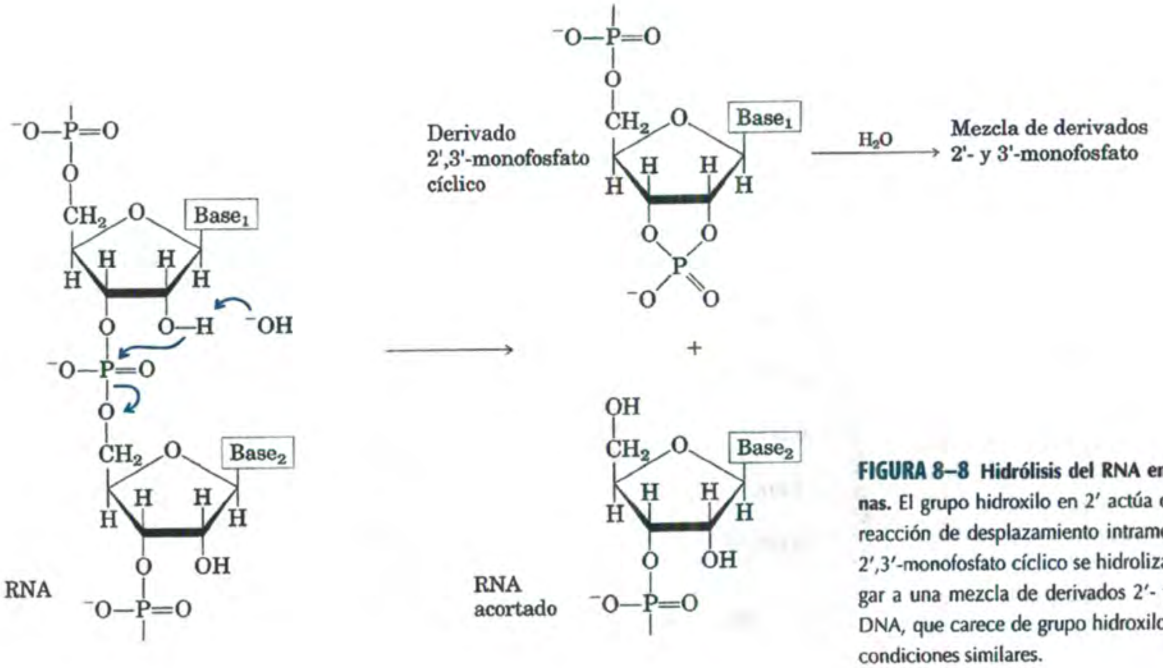
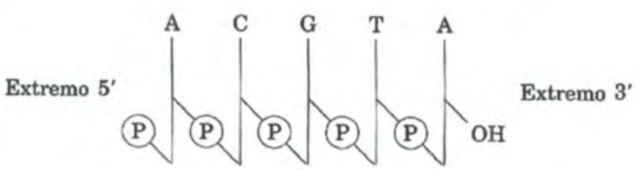


FIGURA 8–8 Hidrólisis del RNA en condiciones alcalinas. El grupo hidroxilo en 2′ actúa de nucleófilo en una reacción de desplazamiento intramolecular. El derivado 2′,3′-monofosfato cíclico se hidroliza a su vez, dando lugar a una mezcla de derivados 2′- y 3′-monofosfato. El DNA, que carece de grupo hidroxilo en 2′, es estable en condiciones similares.

Las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos pueden representarse esquemáticamente, tal como se ilustra a continuación para un segmento de DNA de cinco nucleótidos. Los grupos fosfato se representan con el símbolo Ⓟ, y cada una de las desoxirribosas mediante una línea vertical que va del C-1′ en la parte superior de la línea vertical al C-5′ en la inferior (es importante señalar que en los ácidos nucleicos el azúcar se encuentra siempre en su forma de anillo cerrado, β-furanosa). Las líneas que conectan nucleótidos (que pasan a través de Ⓟ) se dibujan uniendo en diagonal el punto medio (C-3′) de la desoxirribosa de un nucleótido con el extremo inferior (C-5′) del siguiente.



Otras representaciones más sencillas de este pentanucleótido son: pA-C-G-T-A_{OH}, pApCpGpTpA y pACGTA.

CONVENCIÓN CLAVE: La secuencia de una cadena sencilla de ácido nucleico se escribe siempre con el extremo 5′ a la izquierda y el 3′ a la derecha; es decir, en la dirección 5′ → 3′. ■

Un ácido nucleico de cadena corta se denomina **oligonucleótido.** El calificativo de "corta" es en cierta medida arbitrario, aunque el término oligonucleótido se utiliza a menudo para polímeros de hasta 50 nucleótidos. Los ácidos nucleicos de mayor longitud se denominan **polinucleótidos.**

Las propiedades de las bases de los nucleótidos influyen en la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos

Las pirimidinas y purinas libres son compuestos débilmente básicos y por ello se denominan bases. Las purinas y pirimidinas presentes en el DNA y el RNA son moléculas aromáticas (Fig. 8–2). Esta propiedad tiene efectos importantes sobre la estructura, la distribución electrónica y la capacidad de absorción de la luz de los ácidos nucleicos. La deslocalización de los electrones entre los átomos del anillo confiere a la mayoría de los enlaces el carácter de doble enlace parcial. Como consecuencia de este hecho, las pirimidinas son moléculas planas y las purinas casi planas, con una ligera deformación. Las bases purínicas y pirimidínicas libres pueden existir en dos o más formas tautoméricas según el pH. Por ejemplo, el uracilo se presenta en las formas de lactama, lactima y doble lactima **(Fig. 8–9)**.

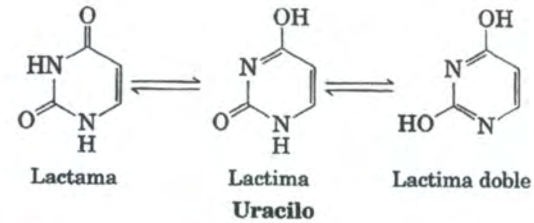
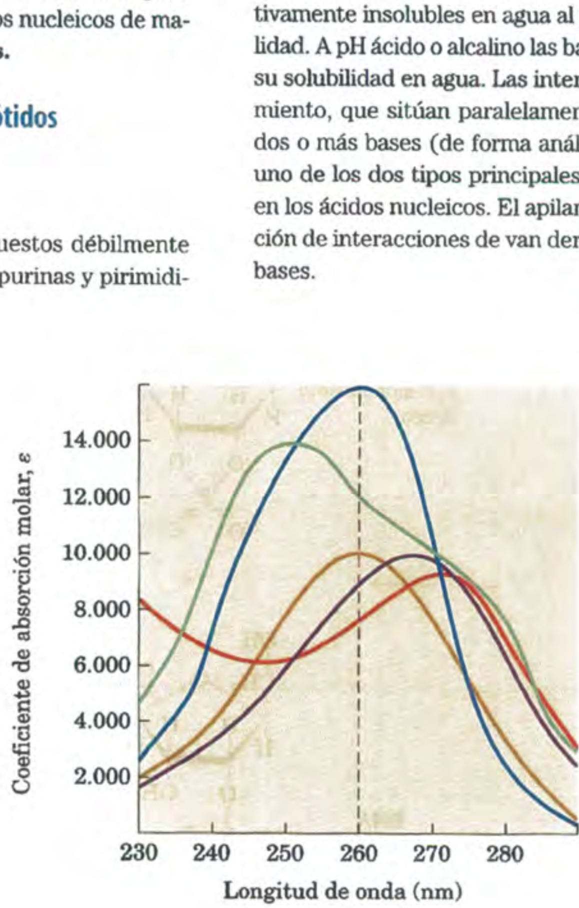


FIGURA 8–9 Formas tautoméricas del uracilo. A pH 7,0, predomina la forma lactama; las otras formas adquieren más importancia al disminuir el pH. Las otras pirimidinas libres y las purinas libres también poseen formas tautoméricas, pero son mucho menos abundantes.

Las estructuras mostradas en la Figura 8-2 son los tautómeros predominantes a pH 7,0. Todas las bases nucleotídicas absorben luz UV, y los ácidos nucleicos se caracterizan por una fuerte absorción a longitudes de onda cercanas a 260 nm **(Fig. 8–10)**.

Las bases purínicas y pirimidínicas son hidrofóbicas y relativamente insolubles en agua al pH celular cercano a la neutralidad. A pH ácido o alcalino las bases adquieren carga y aumenta su solubilidad en agua. Las interacciones hidrofóbicas de apilamiento, que sitúan paralelamente los planos de los anillos de dos o más bases (de forma análoga a una pila de monedas) es uno de los dos tipos principales de interacción entre las bases en los ácidos nucleicos. El apilamiento resulta de una combinación de interacciones de van der Waals y dipolo-dipolo entre las bases.



Coeficiente de absorción molar de los nucleótidos a 260 nm, ε_{260} ($M^{-1}cm^{-1}$)	
AMP	15.400
GMP	11.700
UMP	9.900
dTMP	9.200
CMP	7.500

FIGURA 8–10 Espectros de absorción de los nucleótidos más comunes. Los espectros muestran la variación del coeficiente de absorción molar con la longitud de onda. Los coeficientes de absorción molar a 260 nm y pH 7,0 (ε_{260}) se muestran en la tabla. Los espectros de los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos correspondientes, así como los de los nucleósidos, son esencialmente idénticos. Para las mezclas de nucleótidos se utiliza la longitud de onda de 260 nm (líneas discontinuas verticales) para las mediciones.

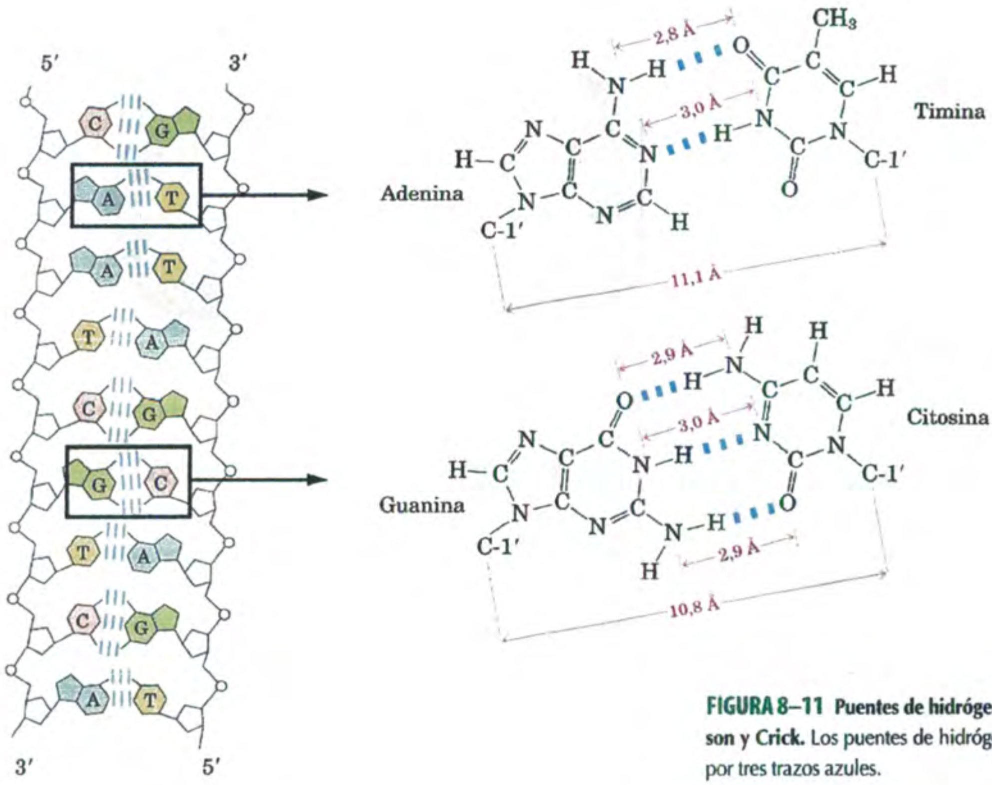


FIGURA 8–11 Puentes de hidrógeno de los pares de bases definidos por Watson y Crick. Los puentes de hidrógeno están representados, como es habitual, por tres trazos azules.

El apilamiento de las bases ayuda a minimizar el contacto con el agua y es de gran importancia en la estabilización de la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, tal como describiremos más adelante.

Los grupos funcionales de las purinas y pirimidinas son los grupos carbonilo y los átomos de nitrógeno del anillo y los grupos amino exocíclicos. La formación de enlaces de hidrógeno, en los que participan los grupos amino y carbonilo, constituye el modo más importante de interacción entre dos (y en ocasiones de tres o cuatro) cadenas de ácido nucleico. Los patrones de enlaces de hidrógeno más frecuentes fueron definidos por James Watson y Francis Crick en 1953; en éstos, la A se une específicamente con T (o U) y la G se une con C **(Fig. 8–11)**. Estos dos tipos de **pares de bases** predominan en el DNA y el RNA de doble cadena, y los tautómeros que se muestran en la Figura 8-2 son los responsables de estos apareamientos. Estel apareamiento específico de las bases permite la duplicación de la información genética, tal como discutiremos más adelante en este capítulo.

James D. Watson

Francis Crick, 1916–2004

RESUMEN 8.1 Conceptos básicos

- Un nucleótido consiste en una base nitrogenada (purina o pirimidina), un azúcar pentosa y uno o más grupos fosfato. Los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster entre el grupo 5′-hidroxilo de una pentosa y el grupo 3′-hidroxilo del siguiente.
- Hay dos tipos de ácidos nucleicos: RNA y DNA. Los nucleótidos de RNA contienen ribosa y las bases pirimidínicas comunes son el uracilo y la citosina. En el DNA los nucleótidos contienen 2′-desoxirribosa y las bases pirimidínicas comunes son la timina y la citosina. Las purinas primarias son la adenina y la guanina en ambos casos.

8.2 Estructura de los ácidos nucleicos

El descubrimiento de la estructura del DNA por Watson y Crick en 1953 fue un momento culminante de la ciencia, del que surgieron disciplinas completamente nuevas y que repercutió en el curso de otras muchas ya establecidas. En este apartado nos centraremos en la estructura del DNA, en los pormenores de su descubrimiento y presentaremos los refinamientos más recientes en nuestro conocimiento del DNA. También describiremos la estructura del RNA.

Como en el caso de la estructura de las proteínas (Capítulo 4), puede resultar de utilidad describir la estructura de los ácidos nucleicos en términos de niveles de complejidad jerarquizados (estructura primaria, secundaria, terciaria). La estructura primaria de un ácido nucleico está definida por su estructura covalente y su secuencia de nucleótidos. Cualquier estructura regular y estable adoptada por algunos o por todos los nucleótidos de un ácido nucleico puede ser considerada como estructura secundaria. Todas las estructuras consideradas

en el resto de este capítulo pueden englobarse bajo el epígrafe de estructura secundaria. En general, se considera estructura terciaria el plegamiento complejo de los grandes cromosomas en el nucleoide bacteriano o en la cromatina eucariótica; la estructura terciaria se trata en el Capítulo 24.

El DNA es una doble hélice que almacena información genética

El DNA fue aislado y caracterizado por primera vez por Friedrich Miescher en 1868. A esta sustancia que contenía fósforo la denominó "nucleína". Hasta la década de 1940 con los trabajos de Oswald T. Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty no hubo pruebas claras de que el DNA era el material genético. Avery y colaboradores encontraron que el DNA extraído de una cepa virulenta (causante de enfermedad) de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, e inyectado a una cepa no virulenta de la misma bacteria, era capaz de transformar una cepa no virulenta en una forma virulenta. Ello les llevó a la conclusión de que el DNA extraído de la cepa virulenta transportaba la información genética de la virulencia. En 1952, los experimentos de Alfred D. Hershey y Martha Chase, en los que estudiaron la infección de células bacterianas por un virus (bacteriófago), con el DNA o la proteína marcados radiactivamente, eliminaron cualquier duda que pudiese persistir de que el DNA, y no la proteína, transportaba la información genética.

Otro elemento de gran importancia en el descubrimiento de la estructura del DNA fue el trabajo de Erwin Chargaff y colaboradores a finales de la década de 1940. Estos científicos observaron que las cantidades relativas de las cuatro bases de los nucleótidos del DNA variaban según el organismo, y que las cantidades relativas de ciertas bases eran prácticamente equivalentes. Estos datos, acumulados a partir de los DNA de un gran número de especies diferentes, permitieron a Chargaff llegar a las siguientes conclusiones:

1. La composición de bases del DNA generalmente varía de una especie a otra.
2. Las muestras de DNA aisladas a partir de tejidos diferentes de la misma especie tienen la misma composición de bases.
3. La composición de bases del DNA de una determinada especie no varía con la edad del organismo, ni con su estado nutricional, ni con las variaciones ambientales.
4. En todos los DNA celulares, independientemente de la especie, el número de residuos de adenosina es igual al de residuos de timidina (es decir, A = T), y el número de residuos de guanosina es igual al número de residuos de citidina (G = C). A partir de estas relaciones se deduce que la suma de los residuos de purina es igual a la suma de los residuos de pirimidina; es decir, A + G = T + C.

Estas relaciones cuantitativas, a veces denominadas "leyes de Chargaff", fueron confirmadas posteriormente por muchos investigadores. Fueron esenciales para la deducción de la estructura tridimensional del DNA y dieron pistas sobre cómo la información genética está codificada en el DNA y cómo se transmite de generación en generación.

Con el fin de estudiar más a fondo la estructura del DNA, Rosalind Franklin y Maurice Wilkins utilizaron el poderoso método de la difracción de rayos X (véase el Recuadro 4–5), para analizar fibras de DNA. A principios de la década de 1950 demostraron que el DNA produce un diagrama de difracción de rayos X característico **(Fig. 8–12)**. A partir de este patrón se dedujo que las moléculas del DNA son helicoidales, con dos periodicidades a lo largo del eje longitudinal, una primaria de 3,4 Å y otra secundaria de 34 Å. El problema consistía, pues, en la construcción de un modelo tridimensional de la molécula de DNA que pudiera explicar no sólo los datos de difracción de rayos X, sino también las equivalencias específicas entre bases, A = T y G = C, descubiertas por Chargaff, junto con otras propiedades químicas del DNA.

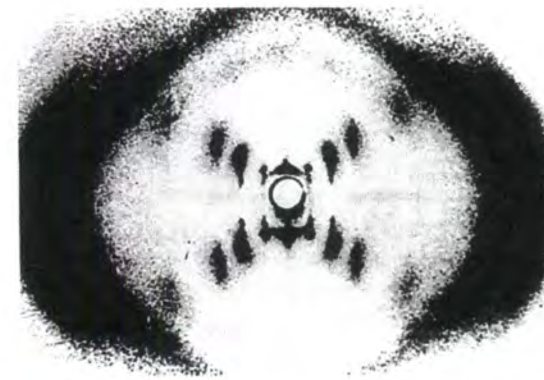


FIGURA 8–12 Diagrama de difracción de rayos X del DNA. Las manchas centrales en forma de cruz revelan la presencia de una estructura en hélice. Las bandas más intensas a la derecha y a la izquierda corresponden a la distancia entre las bases.

Rosalind Franklin, 1920–1958

Maurice Wilkins, 1916–2004

James Watson y Francis Crick se basaron en esta información acumulada sobre el DNA para deducir su estructura. En 1953 propusieron un modelo tridimensional para la estructura del DNA que tenía en cuenta todos los datos disponibles. Consiste en dos cadenas helicoidales de DNA enrolladas alrededor del mismo eje, formando una doble hélice dextrógira (véase el Recuadro 4–1 para una explicación de las estructuras helicoidales dextrógiras y levógiras). Las cadenas hidrofílicas formadas por la desoxirribosa y los grupos fosfato alternados se encuentran en el exterior de la doble hélice, en contacto con el agua circundante. El anillo de furanosa de la desoxirribosa adopta la conformación C-2′ endo. Las bases purínicas y pirimidínicas de ambas cadenas están apiladas en el interior de la doble hélice, con sus estructuras en anillo, hidrofóbicas y prácticamente planas, situadas a muy corta distancia unas de otras y en posición

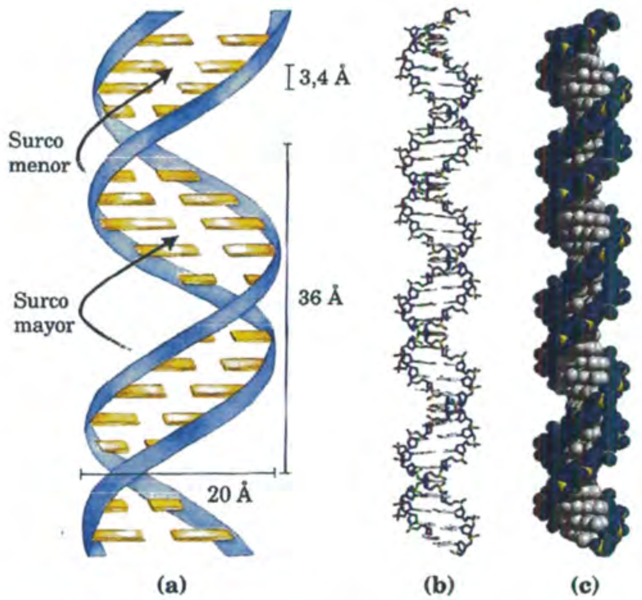


FIGURA 8–13 El modelo de Watson y Crick de la estructura del DNA. El modelo original de Watson y Crick tenía 10 pares de bases por vuelta y 34 Å (3,4 nm) por vuelta de hélice. Mediciones posteriores han mostrado que hay 10,5 pares de bases por vuelta y 36 Å (3,6 nm) por vuelta. **(a)** Representación esquemática que muestra las dimensiones de la hélice. **(b)** Modelo de varillas que muestra el esqueleto covalente y el apilamiento de las bases. **(c)** Modelo de esferas.

perpendicular al eje longitudinal de la hélice. El apareamiento compensado de las dos cadenas da lugar a la formación de un **surco mayor** y un **surco menor** en la superficie de la doble hélice **(Fig. 8–13)**. Cada base de una cadena está apareada en el mismo plano con una base de la otra cadena. Watson y Crick encontraron que los pares de bases unidos por enlaces de hidrógeno, que se ilustran en la Figura 8–11, G con C y A con T, eran los que mejor encajaban en la estructura, proporcionando una explicación para las reglas de Chargaff, según las cuales en todos los DNA G=C y A=T. Es importante observar que se pueden formar tres enlaces de hidrógeno entre G y C, simbolizados por G≡C, mientras que sólo se pueden formar dos entre A y T, simbolizados por A=T. Esta es una de las razones de la mayor dificultad para separar las hebras apareadas del DNA cuanto mayor sea la relación de pares de bases G≡C con respecto a los A=T. Otros apareamientos diferentes tienden, en mayor o menor medida, a desestabilizar la estructura en doble hélice.

Cuando Watson y Crick construyeron su modelo tuvieron que decidir desde el principio si las hebras del DNA debían ser **paralelas** o **antiparalelas,** es decir si sus enlaces 5′,3′-fosfodiéster debían tener la misma dirección o bien direcciones opuestas. La disposición antiparalela proporcionó el modelo más satisfactorio. Trabajos posteriores con DNA polimerasas (Capítulo 25) aportaron argumentos experimentales a favor de que las hebras eran efectivamente antiparalelas, conclusión que fue definitivamente confirmada por análisis de difracción de rayos X.

Con el fin de explicar las periodicidades observadas en el diagrama de difracción de rayos X de fibras de DNA, Watson y Crick construyeron diversos modelos moleculares hasta llegar a una estructura con las bases apiladas verticalmente en el interior de la doble hélice y separadas por una distancia de 3,4 Å; la repetición secundaria de unos 34 Å fue tenida en cuenta con la incorporación de 10 pares de bases en cada vuelta completa de la doble hélice. En disolución acuosa, la estructura es ligeramente diferente de la encontrada en las fibras y posee 10,5 pares de bases por vuelta de hélice (Fig. 8-13).

Como puede observarse en la **Figura 8–14**, las dos cadenas polinucleotídicas antiparalelas del DNA de doble hélice no son idénticas ni en secuencia ni en composición de bases. En cambio, son **complementarias** entre sí. Siempre que hay adenina en una cadena, se encuentra timina en la otra; de modo parecido la presencia de guanina en una cadena implica la presencia de citosina en la otra.

La doble hélice, o dúplex, del DNA se mantiene unido por dos tipos de fuerzas tal como se describió anteriormente: los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarias (Fig. 8–11) y las interacciones de apilamiento de las bases. La complementariedad de las hebras del DNA se debe a los enlaces de hidrógeno de los pares de bases. Las interacciones de apilamiento de las bases, que son esencialmente inespecíficas por lo que respecta a la identidad de las bases apiladas, constituyen la contribución principal a la estabilidad de la doble hélice.

Las principales características del modelo en doble hélice de la estructura del DNA están apoyadas por un gran número de pruebas de tipo químico y biológico. Además, el propio modelo sugirió de inmediato un mecanismo para la transmisión de la información genética. La característica fundamental del modelo es la complementariedad de las dos hebras del DNA. Watson y Crick comprendieron, mucho antes de disponer de pruebas experimentales en su favor, que la replicación de la estructura podía tener lugar naturalmente a través de (1) la separación de las dos hebras y (2) la síntesis de hebras complementarias de cada una de ellas. Puesto que los nucleótidos de cada hebra nueva están unidos según una secuencia determinada por las reglas de apareamiento de ba-

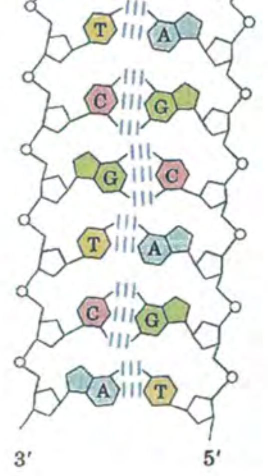


FIGURA 8–14 Complementariedad de las hebras del DNA de doble hélice. Las cadenas antiparalelas complementarias del DNA siguen las reglas de apareamiento propuestas por Watson y Crick. Las dos cadenas antiparalelas apareadas por bases tienen diferente composición: la cadena de la izquierda tiene una composición $A_3T_2G_1C_3$; la de la derecha, $A_2T_3G_3C_1$. La secuencia también es diferente cuando ambas cadenas se leen en dirección 5′ → 3′. Observe las equivalencias de bases: A = T y G = C en el dúplex.

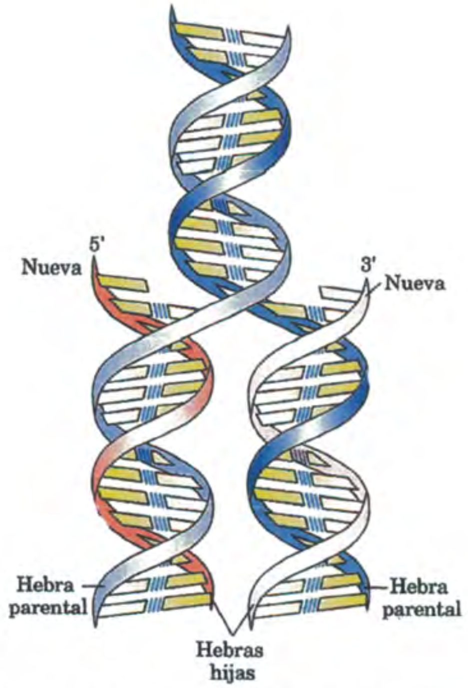


FIGURA 8–15 Replicación del DNA según Watson y Crick. Las hebras preexistentes o "parentales" se separan, y cada una de ellas sirve de molde para la biosíntesis de una hebra complementaria "hija" (en rosa).

ses explicadas anteriormente, cada hebra preexistente hace de molde para dirigir la síntesis de la hebra complementaria **(Fig. 8–15)**. Estas hipótesis se confirmaron experimentalmente, comenzando así una revolución en nuestra comprensión de la herencia biológica.

EJEMPLO PRÁCTICO 8–1 Apareamiento de bases en el DNA

En muestras de DNA aisladas de dos especies bacterianas no identificadas, X e Y, la adenina representa el 32% y el 17%, respectivamente, del total de bases. ¿Qué proporciones relativas de adenina, guanina, timina y citosina esperaría encontrar en las dos muestras de DNA? ¿Qué supuestos ha empleado? Una de estas especies fue aislada de un manantial termal (64 °C). ¿Qué especie es probablemente la bacteria termófila y por qué?

Solución: Para cualquier DNA en doble hélice, A = T y G = C. El DNA de la especie X tiene 32% de A y por lo tanto debe contener 32% de T. Ello representa el 64% de la bases y deja el 36% para los pares G≡C: 18% de G y 18% de C. La muestra de la especie Y, con 17% de A, debe contener 17% de T, correspondiente al 34% de los pares de bases. El 66% restante de las bases está, pues, distribuido a partes iguales como 33% de G y 33% de C. Este cálculo se apoya en el supuesto de que ambas moléculas de DNA son de doble cadena.

Cuanto mayor es el contenido de G+C de una molécula de DNA mayor es su temperatura de fusión. La especie Y, con el DNA con mayor contenido de G+C (66%), es con mucha probabilidad la bacteria termófila; su DNA tiene una mayor temperatura de fusión y por tanto es más estable a la temperatura de la fuente termal.

El DNA puede adoptar diferentes formas tridimensionales

El DNA es una molécula extraordinariamente flexible. Es posible una rotación considerable alrededor de una serie de enlaces de las cadenas de azúcar-fosfato (fosfodesoxirribosa), y las fluctuaciones térmicas pueden provocar la curvatura, el estiramiento y el desapareamiento (fusión) de las hebras. En el DNA celular se observan muchas desviaciones significativas de la estructura de Watson y Crick, y algunas de ellas, si no todas, pueden jugar un papel importante en el metabolismo del DNA. Estas variaciones estructurales no tienen en general ningún efecto sobre las propiedades fundamentales del DNA definidas por Watson y Crick: la complementariedad de las hebras, las hebras antiparalelas y el requerimiento de pares de bases A═T y G≡C.

La variación estructural del DNA refleja tres aspectos: las diferentes conformaciones posibles de la desoxirribosa, la rotación alrededor de enlaces adyacentes que constituyen el esqueleto de fosfodesoxirribosa **(Fig. 8–16a)** y la libre rotación en torno del enlace C-1′-*N*-glucosídico (Fig. 8–16b). Debido a impedimentos estéricos las purinas en los nucleótidos purínicos están limitadas a dos conformaciones estables de la desoxirribosa que se denominan syn y anti (Fig. 8–16b). Las primidinas

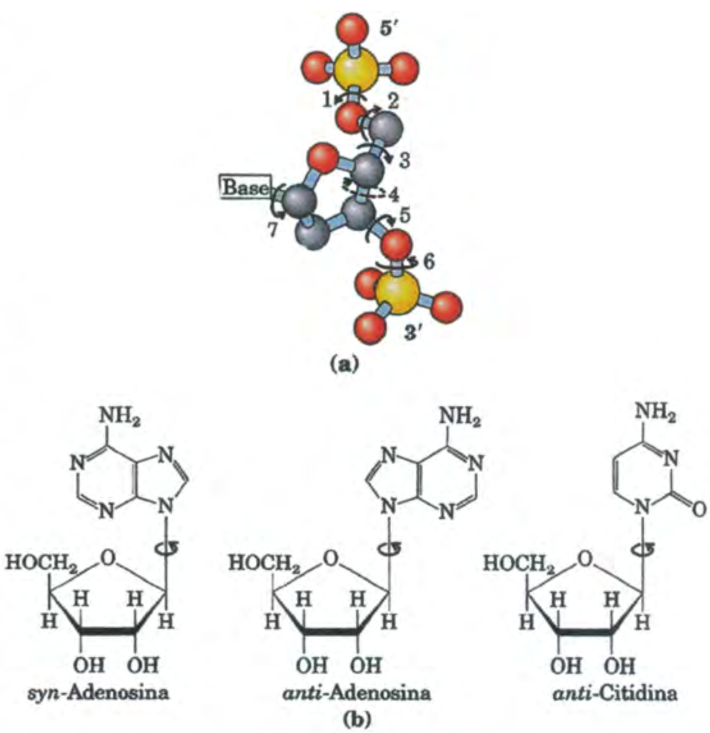


FIGURA 8–16 Variación estructural del DNA. **(a)** La conformación de un nucleótido en el DNA se ve afectada por la rotación en torno a siete enlaces diferentes. La rotación en torno a seis de estos enlaces es libre. La rotación limitada en torno del enlace 4 da lugar a la distorsión del anillo, de manera que uno de los átomos del anillo pentagonal de la furanosa se encuentra fuera del plano que contiene a los otros cuatro. Estas conformaciones son definidas como endo o exo según que el átomo se haya desplazado al mismo lado del plano que C-5′ o al lado opuesto (véase también la Fig. 8–3b). **(b)** Con respecto a la unión a la ribosa, sólo dos conformaciones están permitidas a las purinas, la anti y la syn. Las pirimidinas generalmente se encuentran en la conformación anti.

están limitadas generalmente a la conformación anti a causa de la interferencia estérica entre el azúcar y el oxígeno carbonílico C-2 de la pirimidina.

La estructura de Watson y Crick se conoce también como **forma B del DNA** o B-DNA. La forma B es la estructura más estable que puede adoptar un DNA de secuencia aleatoria en condiciones fisiológicas y es, por tanto, el punto de referencia estándar en los estudios sobre las propiedades del DNA. Las **formas A** y **Z** del DNA son dos variantes estructurales que han sido caracterizadas a fondo en estructuras cristalinas. Estas tres conformaciones del DNA se muestran en la **Figura 8–17**, junto con un resumen de sus propiedades. La forma A predomina en disoluciones relativamente pobres en agua. El DNA está todavía estructurado en una doble hélice dextrógira, pero la hélice es más gruesa y el número de pares de bases por vuelta es de 11, en lugar de los 10,5 del B-DNA. El plano de los pares de bases de la forma A tiene una inclinación de unos 20° con respecto al eje de la hélice. Estos cambios estructurales hacen que el surco ancho sea más profundo y el surco estrecho más superficial. Los reactivos utilizados para promover la cristalización del DNA tienden a deshidratarlo y por eso muchos DNA cortos cristalizan en forma A.

El Z-DNA supone una desviación mucho más radical con respecto a la forma B; la diferencia más clara es la rotación a izquierdas (levógira) de la hélice. Contiene 12 pares de bases por vuelta, y la estructura es más delgada y alargada. Las cadenas del DNA adoptan un plegamiento en zig-zag. Ciertas secuencias de nucleótidos se pliegan más fácilmente que otras en hélices Z levógiras. Los ejemplos más característicos son las secuencias en las que se alternan pirimidinas y purinas, especialmente aquellas en las que se alternan residuos C y G o 5-metil-C y G. Con el fin de formar parte de la doble hélice levógira del DNA las purinas adoptan la conformación syn mientras que las pirimidinas conservan la conformación anti. En el DNA Z el surco mayor es apenas perceptible, y el surco menor es estrecho y profundo.

No está claro todavía que el A-DNA se encuentre en las células, pero hay datos a favor de la presencia de fragmentos cortos (zonas) de Z-DNA tanto en procariotas como en eucariotas. Estas regiones de Z-DNA pueden tener un papel (todavía por definir) en la regulación de la expresión de algunos genes o en la recombinación genética.

Algunas secuencias de DNA adoptan estructuras no habituales

Se han encontrado otras variaciones estructurales dependientes de la secuencia que pueden afectar a las funciones y el metabolismo de fragmentos de DNA situados en su inmediata vecindad. Por ejemplo, siempre que se encuentren cuatro o más residuos adenosina consecutivos en una de las hebras se produce la curvatura de la hélice. Seis adenosinas seguidas causan una curvatura de aproximadamente 18°. La curvatura observada en ésta y otras secuencias puede tener importancia en la unión de algunas proteínas al DNA.

Un tipo de secuencia bastante común en el DNA es el **palíndromo.** Un palíndromo es una palabra, frase o verso que se deletrea de manera idéntica leyéndola del derecho o del revés; por ejemplo, "Dábale arroz a la zorra el abad". Este término se aplica a regiones del DNA con **repeticiones invertidas** de secuencia de bases con simetría binaria en las dos hebras del DNA **(Fig. 8–18)**. Estas secuencias son autocomplementarias en cada una de las hebras y tienen, por tanto, el potencial de formar estructuras en **horquilla** o estructuras **cruciformes** (en forma de cruz) **(Fig. 8–19)**. Cuando la repetición invertida se encuentra en ambas hebras del DNA, recibe el nombre de **repetición especular.** Las repeticiones especulares no

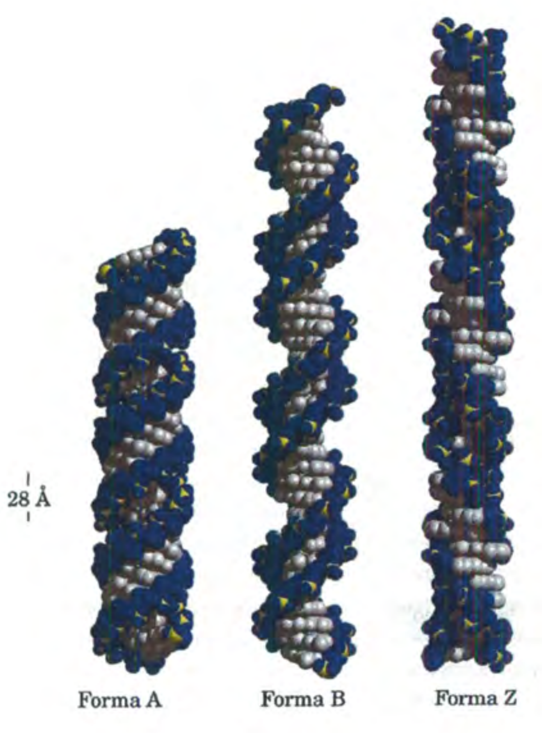


FIGURA 8–17 Comparación de las formas A, B y Z del DNA. Las estructuras mostradas en la figura tienen todas ellas 36 pares de bases. Las bases se muestran en gris, los fosfatos en amarillo y las ribosas y los oxígenos de los fosfatos en azul. El color azul se usa en los restantes capítulos para representar las hebras del DNA. La tabla resume algunas de las propiedades de las tres formas del DNA.

	Forma A	Forma B	Forma Z
Sentido de la hélice	Dextrógira	Dextrógira	Levógira
Diámetro	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Pares de bases por vuelta de hélice	11	10,5	12
Translación por par de bases	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
Inclinación de las bases respecto a la perpendicular al eje de la hélice	20°	6°	7°
Conformación del azúcar	C-3′ endo	C-2′ endo	C-2′ endo para pirimidinas; C-3′ endo para purinas
Conformación del enlace glucosídico	Anti	Anti	Anti para pirimidinas; syn para purinas

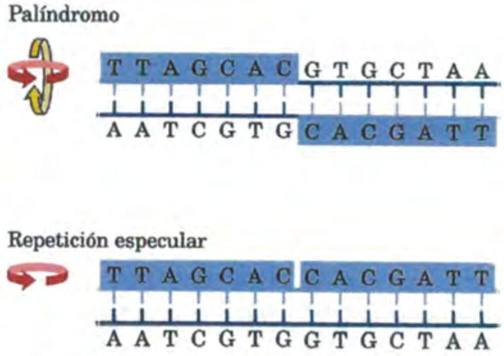


FIGURA 8–18 Palíndromos y repeticiones especulares. Los palíndromos son secuencias de los ácidos nucleicos de doble cadena con simetría binaria. Para superponer una repetición (secuencia sombreada) sobre la otra debe realizarse una rotación de 180° alrededor del eje horizontal, y a continuación otra de 180° alrededor del eje vertical, tal como muestran las flechas coloreadas. Por su parte, una repetición especular presenta una secuencia simétrica en cada hebra. La superposición de una repetición sobre la otra requiere una única rotación alrededor del eje vertical.

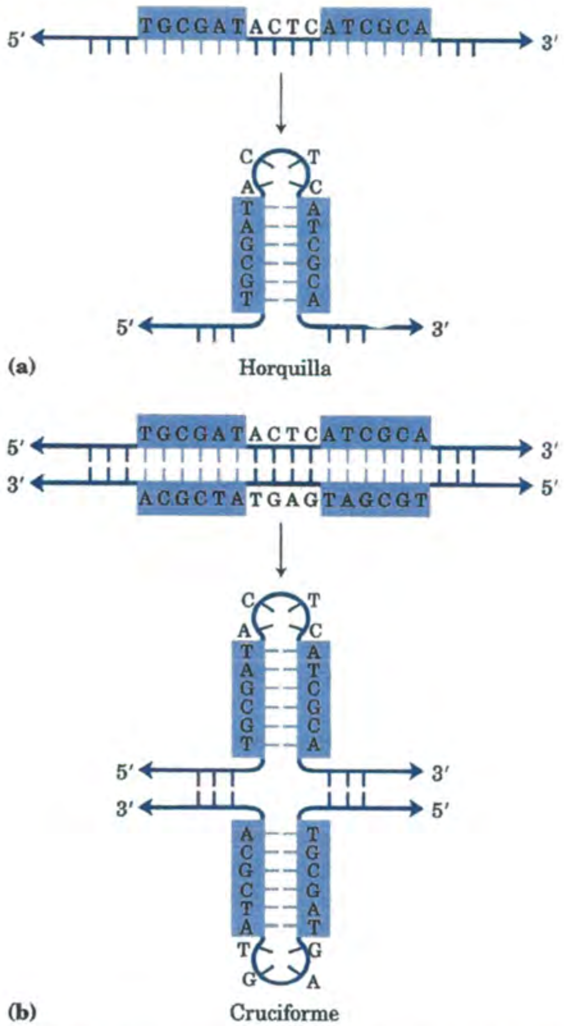


FIGURA 8–19 Horquillas y cruciformes. Las secuencias palindrómicas del DNA (o del RNA) pueden formar estructuras alternativas mediante apareamiento de bases intracatenario. **(a)** Cuando está implicada únicamente una de las hebras del DNA (o del RNA) se denomina estructura en horquilla. **(b)** Cuando están implicadas las dos hebras de un dúplex de DNA, la estructura se denomina cruciforme. El sombreado en azul resalta las secuencias asimétricas que pueden aparearse con una secuencia complementaria ya sea en la misma hebra o en la hebra opuesta.

tienen secuencias complementarias en la misma hebra y no pueden formar estructuras en horquilla o cruciformes. Secuencias de estos tipos se encuentran prácticamente en todas las moléculas de DNA de gran tamaño y pueden abarcar entre unos pocos y varios miles de pares de bases. Se desconoce en qué medida los palíndromos adoptan la estructura cruciforme en las células, aunque se ha demostrado la existencia in vivo de algunas estructuras cruciformes en *Escherichia coli*. Las secuencias autocomplementarias hacen que las hebras sencillas de DNA (o RNA) aisladas se plieguen en disolución en forma de estructuras complejas que contienen múltiples horquillas.

Varias estructuras poco comunes del DNA constan de tres o incluso cuatro hebras. Los nucleótidos que participan en los pares de bases de Watson y Crick (Figura 8–11) pueden formar puentes de hidrógeno adicionales, sobre todo con los grupos funcionales que se encuentran en el surco mayor. Por ejemplo, un residuo de citidina (si está protonado) puede aparearse con la guanosina de un par de bases G≡C, y la timidina puede aparearse con la adenosina de un par de bases A═T (**Figura 8–20**). Los átomos N-7, O^6 y N^6 de las purinas que participan en los puentes de hidrógeno del DNA tríplex son conocidos a menudo como **posiciones de Hoogsteen,** y el apareamiento, que no sigue el patrón de Watson y Crick, se denomina **apareamiento de Hoogsteen,** según Karst Hoogsteen, quien en 1963 sugirió por primera vez la posibilidad de esta modalidad de apareamiento. Estos apareamientos permiten la formación de **DNA tríplex.** Los tríplex mostrados en la Figura 8-20 (a, b) son más estables a pH bajo porque el triplete C≡G • C^+ requiere una citosina protonada. En el tríplex, el pK_a de esta citosina es >7,5, mientras que su valor normal es de 4,2. Los tríplex también se forman más fácilmente con largas secuencias que contengan sólo pirimidinas o sólo purinas en una de las hebras. Algunos tríplex de DNA contienen dos hebras de pirimidina y una hebra de purina; otros contienen dos hebras de purina y una de pirimidina.

También es posible el apareamiento de cuatro hebras para formar un tetráplex (también llamado cuadrúplex), pero sólo se forma con facilidad en secuencias de DNA con una muy alta proporción de residuos de guanosina (Figura 8–20c,d). El tetráplex de guanosina, o **tetráplex G,** es muy estable en un amplio abanico de condiciones. La orientación de las hebras en el tetráplex puede variar tal como se muestra en la Figura 8–20e.

En el DNA celular, los sitios de reconocimiento de muchas proteínas que se unen a secuencias específicas de DNA (Capítulo 28) tienen secuencias palindrómicas, y en las regiones implicadas en la regulación de la expresión de algunos genes eucarióticos se encuentran secuencias de polipurina y polipirimidina que pueden formar hélices triples. En principio, hebras de DNA sintético, diseñadas para aparearse con estas secuencias y formar hélices triples, podrían alterar la expresión génica. El control del metabolismo celular mediante estos métodos tiene cada vez mayor importancia comercial por sus aplicaciones potenciales en medicina y agricultura.

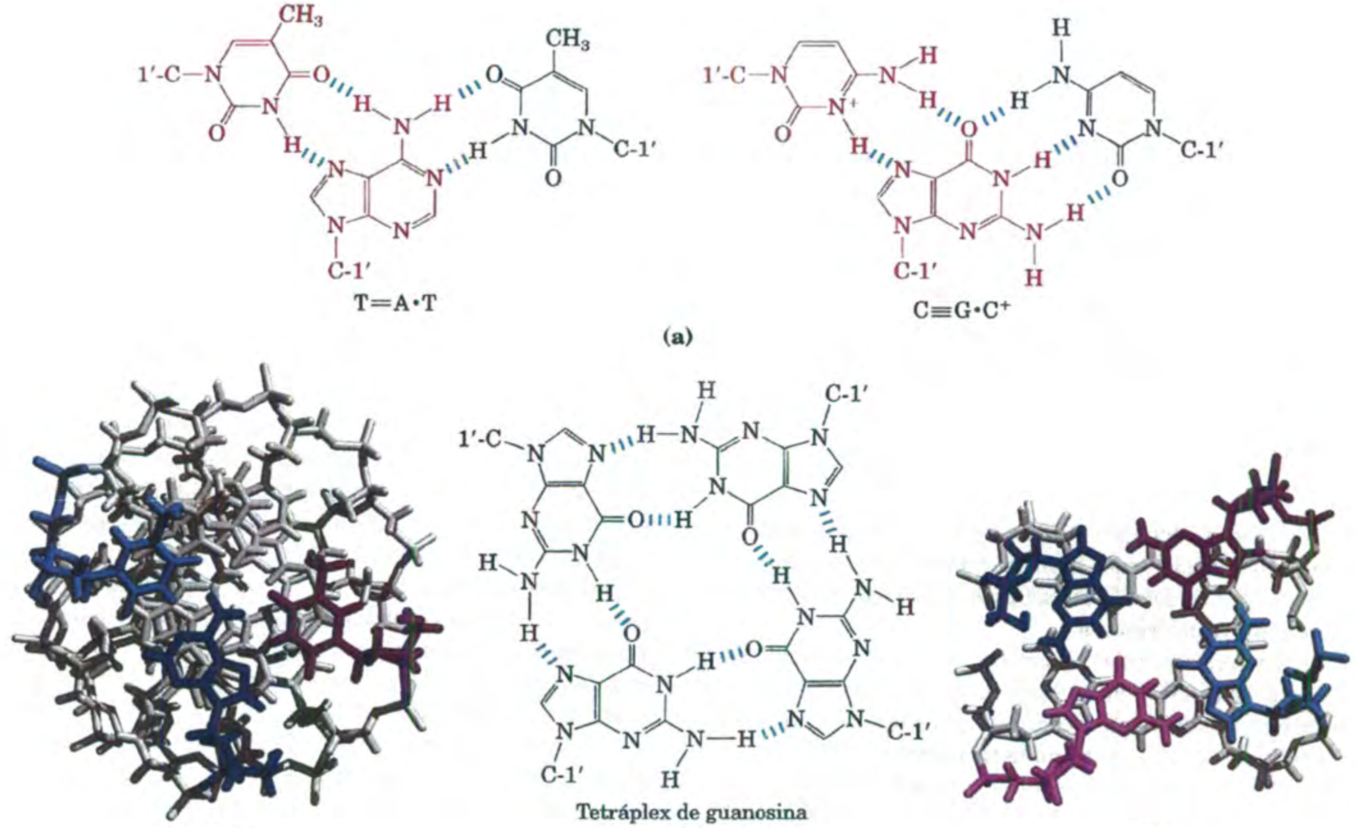
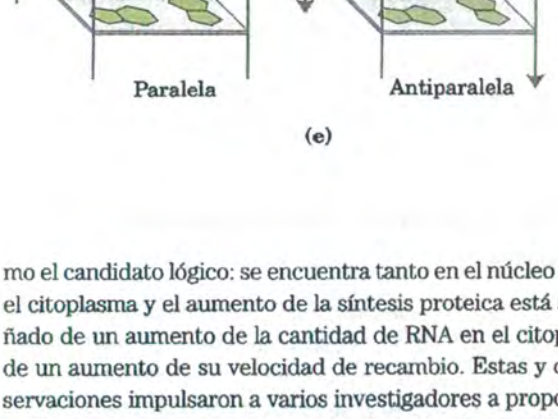


FIGURA 8–20 Estructuras de DNA con tres y cuatro hebras. **(a)** Patrones de apareamiento de una forma de DNA tríplex bien caracterizada. El par de Hoogsteen se muestra en rojo en ambos casos. **(b)** DNA de hélice triple con dos hebras de pirimidina (poli (C)) (proveniente de PDB ID 1BCE) y una hebra de purina (poli (A)). Las hebras azul oscuro y azul claro son antiparalelas y están asociadas por patrones de apareamiento normales de Watson y Crick. La tercera hebra (toda de pirimidinas) es paralela a la hebra de purina (púrpura) y está apareada con puentes de hidrógeno distintos de los de Watson y Crick. La vista es desde un extremo y se representan cinco tripletes. Sólo el triplete más cercano al observador está coloreado. **(c)** Patrón de apareamiento de bases en la estructura del tetráplex de guanosina. **(d)** Dos cuartetos sucesivos de una estructura tetráplex, vistos desde un extremo y con el más cercano del observador en color. **(e)** Posibles variantes en la orientación de las hebras en un tetráplex G.



Los RNA mensajeros codifican las cadenas polipeptídicas

Vamos ahora a dirigir nuestra atención a la expresión de la información genética que contiene el DNA. El RNA, el segundo tipo principal de ácido nucleico de la célula, desempeña muchas funciones. En la expresión génica actúa de intermediario en la conversión de la información codificada en el DNA en la secuencia de aminoácidos de las proteínas funcionales.

En los eucariotas, el DNA se encuentra en su mayor parte confinado en el núcleo, mientras que la síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas del citoplasma. Por lo tanto, una molécula distinta del DNA debe transportar el mensaje genético necesario para la síntesis de proteínas desde el núcleo hasta el citoplasma. Ya en la década de 1950, el RNA era considerado como el candidato lógico: se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma y el aumento de la síntesis proteica está acompañado de un aumento de la cantidad de RNA en el citoplasma y de un aumento de su velocidad de recambio. Estas y otras observaciones impulsaron a varios investigadores a proponer que el RNA transportaba la información genética desde el DNA hasta los ribosomas, donde se sintetizan las proteínas. En 1961, François Jacob y Jacques Monod presentaron una teoría unificada (esencialmente correcta) de los diversos aspectos de este proceso. Propusieron el nombre de RNA mensajero (mRNA) para la porción de RNA celular total que traslada la información genética desde el DNA a los ribosomas, donde los mensajeros actúan de molde para especificar las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas. A pesar de que la longitud de los

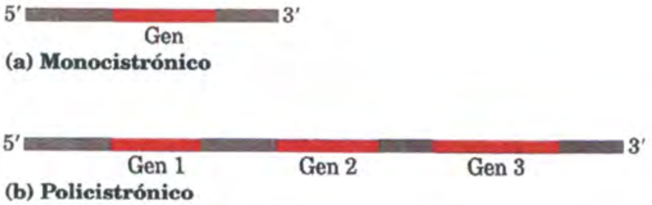


FIGURA 8–21 mRNA bacteriano. Diagramas esquemáticos de un mRNA monocistrónico **(a)** y de otro policistrónico **(b)** bacterianos. Los segmentos rojos representan el RNA que codifica un producto génico; los segmentos grises representan RNA no codificante. En el transcrito policistrónico, los tres genes están separados por RNA no codificante.

mRNA de genes diferentes puede variar mucho, los mRNA de un gen determinado tienen normalmente un tamaño definido. El proceso de formación del mRNA sobre un molde de DNA se conoce como **transcripción.**

En bacterias y arqueobacterias, una única molécula de mRNA puede codificar una o varias cadenas polipeptídicas. Si únicamente contiene información para la síntesis de un solo polipéptido, el mRNA es **monocistrónico;** si codifica dos o más polipéptidos diferentes, el mRNA es **policistrónico.** Los mRNA eucarióticos son, en su mayoría, monocistrónicos. (El término cistrón, por cuanto afecta a esta discusión, es sinónimo de un gen. El término tiene sus raíces históricas en la genética, pero su definición genética rigurosa va más allá del ámbito de este texto.) La longitud mínima de un mRNA viene determinada por la longitud de la cadena polipeptídica que codifica. Por ejemplo, una cadena polipeptídica de 100 residuos aminoácidos requiere una secuencia codificante de RNA de al menos 300 nucleótidos, puesto que cada aminoácido está codificado por un triplete de nucleótidos (éste y otros detalles de la síntesis proteica son tratados en el Capítulo 27). Sin embargo, los mRNA transcritos a partir del DNA son siempre algo más largos de lo estrictamente necesario para codificar una secuencia (o secuencias) polipeptídica. El RNA no codificante adicional incluye secuencias que regulan la síntesis proteica. En la **Figura 8–21** se resume la estructura general de los mRNA bacterianos.

Muchos RNA tienen estructuras tridimensionales más complejas

El RNA mensajero es sólo una de las varias clases de RNA celulares. Los RNA de transferencia actúan como moléculas adaptadoras en la síntesis proteica; unidos covalentemente a un aminoácido por un extremo, se aparean por el otro extremo con el mRNA, de forma que los aminoácidos se unen a la cadena polipeptídica en proceso de crecimiento con la secuencia correcta. Los RNA ribosómicos son componentes de los ribosomas. También se conoce una amplia variedad de RNA con funciones especiales, incluyendo algunos con actividad enzimática (denominados ribozimas). Todos ellos se describen en detalle en el Capítulo 26. Las diversas y a menudo complejas funciones de estos RNA son reflejo de una diversidad de estructuras mucho más rica que la observada en el DNA.

El producto de la transcripción del DNA es siempre un RNA de cadena sencilla. Las monohebras tienden a adoptar una conformación helicoidal dextrógira, dominada por las interacciones de apilamiento de las bases **(Fig. 8–22)**, que son más fuertes entre dos purinas que entre una purina y una pirimidina o entre dos pirimidinas. La interacción purina-purina es tan fuerte que una pirimidina que se encuentre entre dos purinas suele ser desplazada de la estructura de bases apiladas para que las dos purinas puedan interaccionar. Cualquier secuencia autocomplementaria de la molécula dará lugar a estructuras más complejas. El RNA puede formar pares de bases con regiones complementarias de RNA o de DNA. Las reglas de apareamiento son las mismas que en el DNA: la G se aparea con la C y la A con el U (o con los raros residuos de T de algunos RNA). Una diferencia es que el apareamiento entre residuos de G y U, muy raro en el DNA, es bastante frecuente en el RNA (véase la Fig. 8–24). Las hebras de RNA o de RNA y DNA se aparean de modo antiparalelo, como en el DNA.

A diferencia de la doble hélice del DNA, no existe una estructura secundaria regular y simple que pueda servir de referencia para la estructura del RNA. Las estructuras tridimensionales de muchos RNA, al igual que en las proteínas, son complejas y únicas. Las interacciones débiles, y en especial las interacciones de apilamiento de las bases, ayudan a estabilizar las estructuras, al igual que en el DNA. Allí donde se encuentran secuencias complementarias, la estructura en doble hebra predominante es una doble hélice dextrógira en forma A. En el laboratorio se han conseguido hélices en forma Z (en condiciones de muy alta fuerza iónica o elevada temperatura). No se ha observado la forma B en el RNA. Son frecuentes las

FIGURA 8–22 Típico apilamiento dextrógiro de una RNA de cadena sencilla. Las bases se muestran en gris, los átomos de fósforo en amarillo y las ribosas y los oxígenos de los fosfatos en verde. El verde se usa en los siguientes capítulos para representar el RNA, mientras que el azul se usa para representar el DNA.

interrupciones en la hélice A regular a causa de bases no apareadas o incorrectamente apareadas en una o en las dos hebras, y ello da lugar a la formación de protuberancias o bucles internos **(Fig. 8–23)**. Los bucles en horquilla se forman entre secuencias autocomplementarias cercanas. El potencial de formación de estructuras helicoidales con apareamiento de bases es muy grande en muchos RNA **(Fig. 8–24)**, y las horquillas resultantes son el tipo estructura secundaria más común en el RNA. Ciertas secuencias cortas (tales como UUCG) se encuentran a menudo en los extremos de las horquillas de RNA, y se ha observado que forman bucles particularmente rígidos y estables. Es posible que estas secuencias tengan un papel importante en la nucleación del plegamiemto de las moléculas de RNA en su estructura tridimensional. Otros enlaces de hidrógeno diferentes de los enlaces estándar definidos por los apareamientos de Watson y Crick también contribuyen a la estructura. Por ejemplo, el grupo 2′-hidroxilo de la ribosa puede formar un enlace de hidrógeno con otros grupos. Algunas de estas propiedades pueden observarse en la estructura del fenilalanil-tRNA de levadura —el tRNA responsable de insertar residuos de Phe en los polipéptidos— y en dos enzimas de RNA, o ribozimas, cuyas pro-

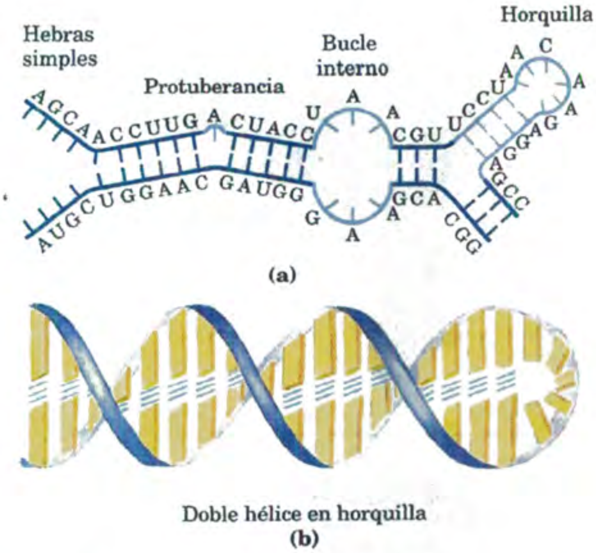
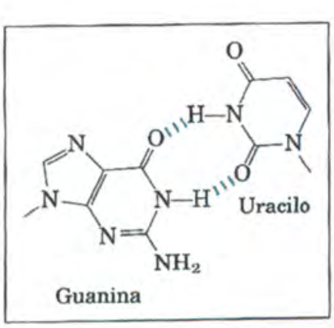
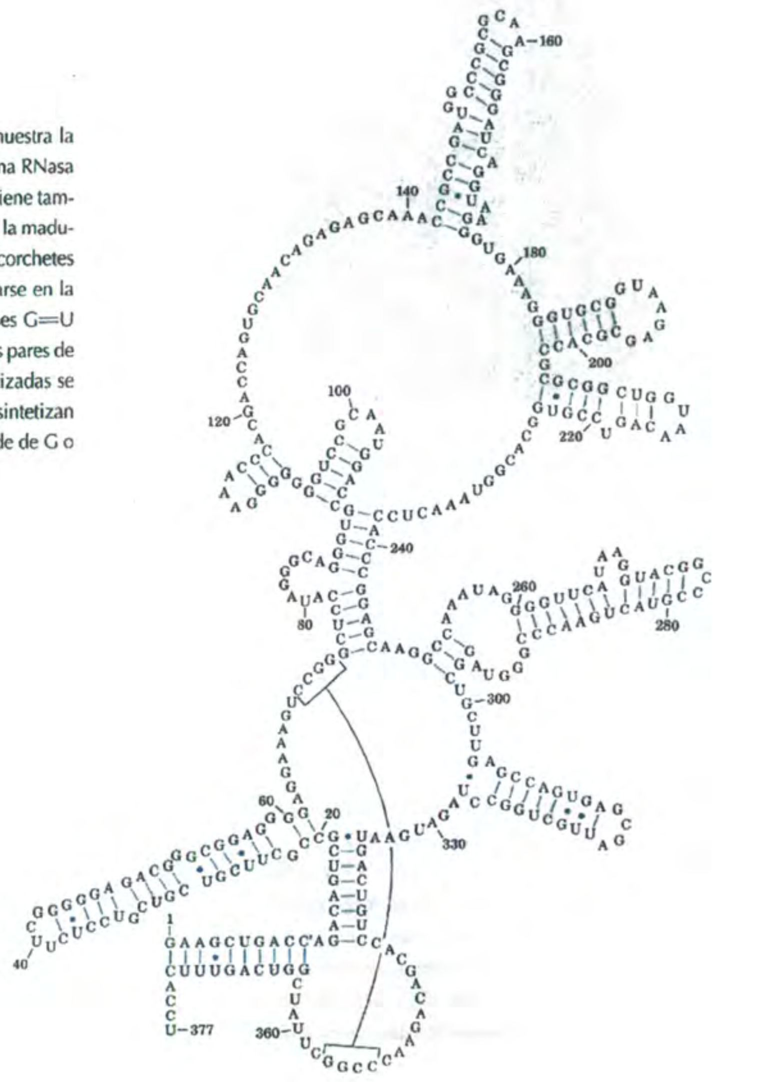


FIGURA 8–23 Estructura secundaria del RNA. (a) Protuberancia, bucle interno y bucle en horquilla. (b) Las regiones apareadas adoptan generalmente una estructura en hélice dextrógira en la forma A, tal como se muestra para una horquilla.

FIGURA 8–24 Estructuras helicoidales apareadas de un RNA. Se muestra la posible estructura secundaria del RNA M1, un componente del enzima RNasa P de *E. coli*, en la que se observan muchas horquillas. La RNasa P contiene también un componente proteico (no representado). Este enzima actúa en la maduración de los RNA de transferencia (véase la Fig. 26–27). Los dos corchetes señalan secuencias complementarias adicionales que pueden aparearse en la estructura tridimensional. Los puntos azules indican los pares de bases G═U (en el recuadro) que no son de Watson y Crick. Hay que señalar que los pares de bases G═U se forman solamente cuando cadenas de RNA presintetizadas se pliegan sobre sí mismas. No hay RNA polimerasas (los enzimas que sintetizan RNA sobre un molde de DNA) que inserten un U enfrente de un molde de G o viceversa durante la síntesis de RNA.





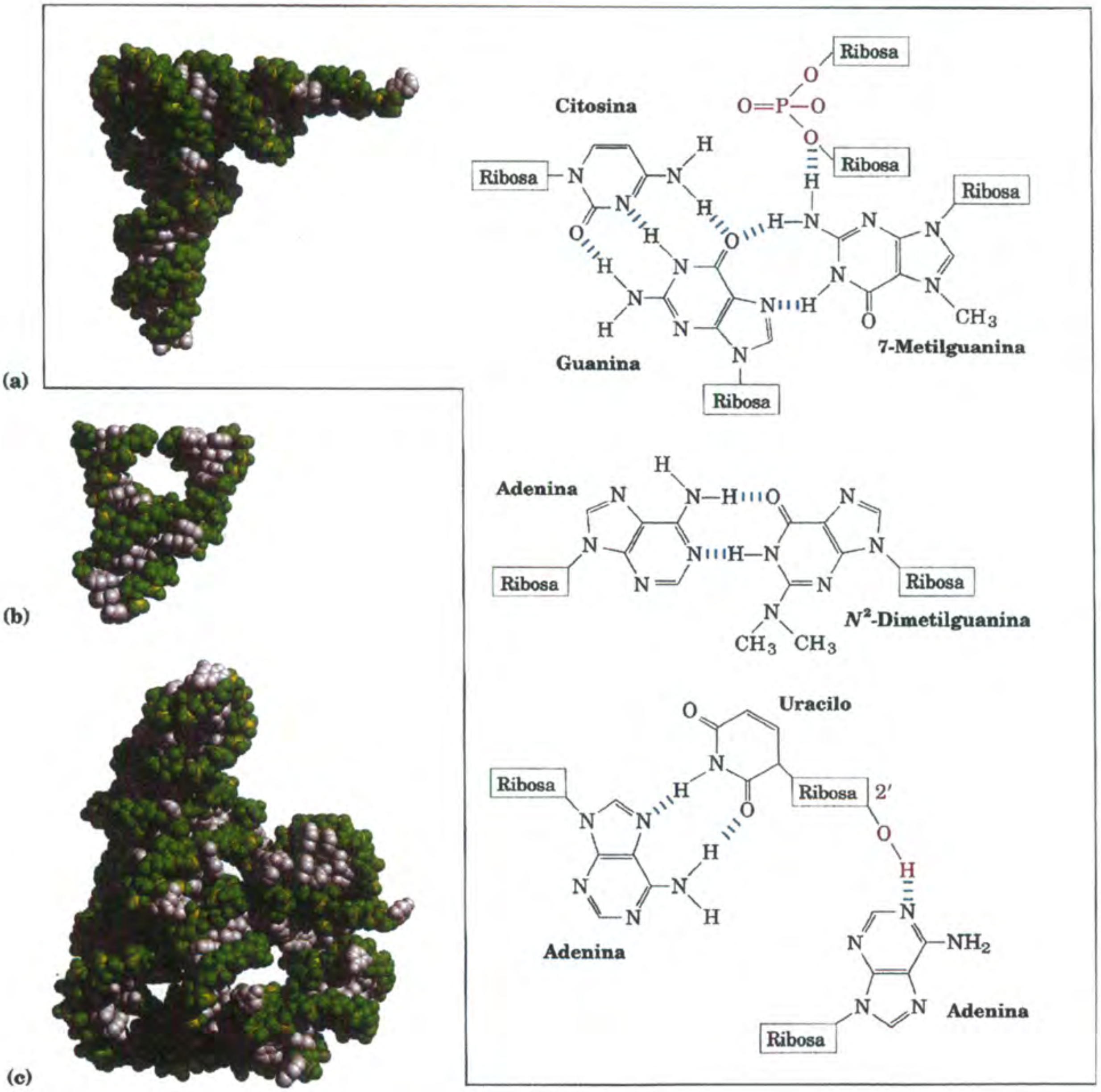


FIGURA 8–25 Estructura tridimensional del RNA. (a) Estructura tridimensional del fenilalanina-tRNA de levadura (PDB ID 1TRA). En este tRNA se encuentran algunos apareamientos de bases no habituales. Observe también la participación de un oxígeno del enlace fosfodiéster en un enlace de hidrógeno y de un grupo 2′-hidroxilo de una ribosa en otro (ambos en rojo). **(b)** Ribozima en cabeza de martillo (llamado así porque la estructura secundaria en el sitio activo recuerda la cabeza de un martillo) de algunos virus vegetales (proveniente de PDB ID 1MME). Los ribozimas, o enzimas de RNA, catalizan diversas reacciones, principalmente del metabolismo del RNA y de la síntesis proteica. Las complejas estructuras tridimensionales de estos RNA reflejan la complejidad inherente a la catálisis, tal como se ha descrito para los enzimas proteicos en el Capítulo 6. **(c)** Segmento de mRNA, conocido como un intrón, del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* (obtenido de PDB ID 1GRZ). Este intrón (un ribozima) cataliza su propia escisión entre dos exones en una hebra de mRNA (discutido en el Capítulo 26).

piedades, como las de las proteínas enzimáticas, dependen de la estructura tridimensional **(Fig. 8–25)**.

El análisis de la estructura del RNA y de la relación entre estructura y función es un tema emergente de investigación, que presenta un grado de complejidad equivalente al del análisis de la estructura de las proteínas. La importancia del conocimiento de la estructura del RNA crece a medida que aumenta la información sobre el número de funciones que estas moléculas llevan a cabo.

RESUMEN 8.2 Estructura de los ácidos nucleicos

- Hay muchos datos a favor de que el DNA contiene la información genética. En concreto, el experimento de Avery-MacLeod-McCarty reveló que el DNA aislado de una cepa bacteriana puede incorporarse y transformar a las células de otra cepa, confiriéndoles algunas de las características heredables de la cepa donante. El experimento de

Hershey-Chase mostró que el DNA de un virus bacteriano, pero no así su cápsida proteica, contiene el mensaje genético para la replicación del virus en la célula huésped.

- Como resulatado de la síntesis de muchos datos publicados, Watson y Crick propusieron que el DNA nativo consiste en dos cadenas antiparalelas dispuestas en forma de doble hélice dextrógira. Los pares de bases complementarios A═T y G≡C y se forman mediante puentes de hidrógeno dentro de la hélice. Los pares de bases están apilados perpendicularmente al eje mayor de la doble hélice, separados por 3,4 Å y con 10,5 pares de bases por vuelta.
- El DNA puede adoptar diferentes formas estructurales. Dos variantes de la forma de Watson y Crick, o B-DNA, son el A-DNA y el Z-DNA. Algunos cambios estructurales dependientes de secuencia provocan la curvatura de la molécula de DNA. Hebras de DNA con secuencias apropiadas pueden formar estructuras en horquilla/cruciformes o DNA tríplex o tetráplex.
- El RNA mensajero transfiere la información genética del DNA a los ribosomas para la síntesis proteica. El RNA de transferencia y el RNA ribosómico también están implicados en la síntesis proteica. El RNA puede ser estructuralmente complejo; las cadenas sencillas de RNA pueden plegarse formando horquillas, regiones de doble cadena y bucles complejos.

8.3 Química de los ácidos nucleicos

El papel del DNA como depositario de la información genética depende en parte de su estabilidad intrínseca. Las transformaciones químicas en ausencia de un catalizador enzimático son generalmente muy lentas. Sin embargo, el almacenamiento de la información a largo plazo sin que sufra alteraciones es tan importante para la célula, que incluso reacciones muy lentas que alteren la estructura del DNA, pueden tener significado fisiológico. Procesos tales como la carcinogénesis y el envejecimiento pueden estar íntimamente ligados a la lenta acumulación de alteraciones irreversibles en el DNA. Otras alteraciones no destructivas, tales como la separación de las hebras previa a la replicación o la transcripción del DNA, también son importantes. Además de proporcionarnos información sobre procesos fisiológicos, el conocimiento de la química de los ácidos nucleicos nos ha dotado de una poderosa gama de metodologías que tienen aplicación en biología molecular, medicina y medicina legal. A continuación examinaremos las propiedades químicas del DNA y algunas de estas tecnologías.

El DNA y el RNA de doble hélice pueden desnaturalizarse

Las disoluciones de DNA nativo que haya sido cuidadosamente aislado son muy viscosas a pH 7,0 y temperatura ambiente (25 °C). Cuando una disolución de estas características se somete a valores extremos de pH o a temperaturas superiores a los 80 °C, su viscosidad desciende abruptamente, lo cual indica que el DNA ha sufrido un cambio en su estado físico. De la misma manera que el calor y los valores extremos de pH provocan la desnaturalización de las proteínas globulares, también producen la desnaturalización, o fusión, del DNA de doble hélice. La rotura de los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases y del apilamiento de las bases provoca el desenrollamiento de la doble hélice, dando lugar a dos hebras sencillas completamente separadas una de otra en toda o en parte de su extensión (desnaturalización parcial). La desnaturalización no rompe ningún enlace covalente del DNA **(Fig. 8–26)**.

La renaturalización del DNA es un proceso rápido de un solo paso, siempre que todavía exista un segmento en doble hélice de una docena o más residuos que mantenga unidas las dos hebras. Cuando la temperatura o el pH retornan a valores situados dentro de los márgenes biológicos, los segmentos desenrollados de las dos hebras vuelven a enrollarse espontáneamente, o a **hibridar,** para restablecer el dúplex intacto (Fig. 8–26). Sin embargo, si las dos hebras están completamente separadas, la renaturalización se produce en dos pasos. En el primero, relativamente lento, las dos hebras se "reconocen" mediante colisiones al azar hasta formar un fragmento corto de doble hélice complementaria. El segundo paso es mucho más rápido: las bases no apareadas restantes entran en registro y se aparean sucesivamente como en una "cremallera" para formar la doble hélice.

Las interacciones próximas del apilamiento de las bases de los ácidos nucleicos dan lugar a una disminución de la absorción de la luz UV, en relación con la absorción de una disolución de nucleótidos libres de la misma concentración; la absorción disminuye todavía más cuando se forma la doble cadena. Este fe-

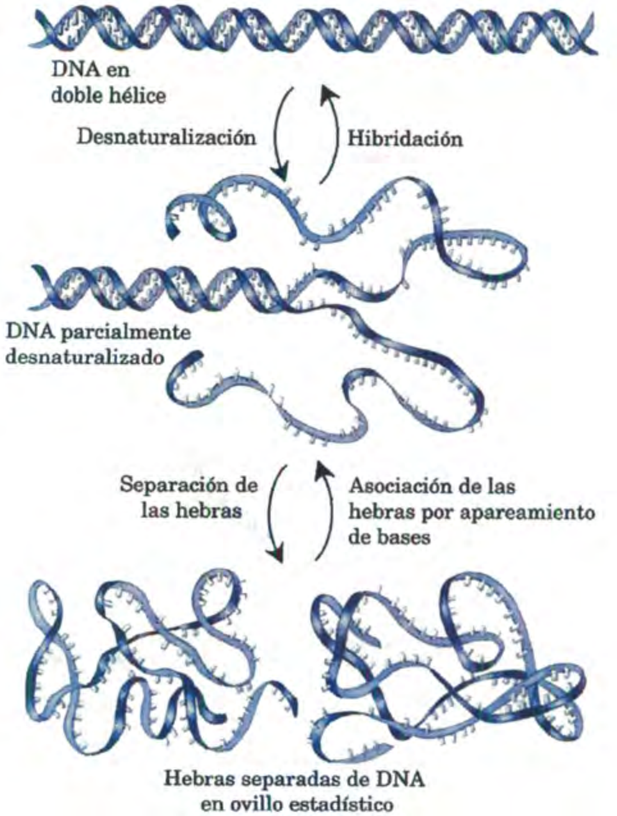


FIGURA 8–26 Desnaturalización e hibridación (renaturalización) reversible del DNA.

nómeno se denomina efecto hipocrómico. La desnaturalización de un ácido nucleico de doble cadena produce el efecto contrario, es decir, un incremento de la absorción, denominado efecto hipercrómico. La transición del DNA de cadena doble a la forma de cadena sencilla desnaturalizado puede seguirse, por tanto, midiendo la absorción de luz UV de 260 nm.

Las moléculas de DNA de origen bacteriano o vírico en disolución se desnaturalizan cuando se calientan lentamente (**Fig. 8–27**). Cada especie de DNA tiene una temperatura de desnaturalización característica, denominada punto de fusión (t_m; formalmente, la temperatura a la cual la mitad del DNA se encuentra como hebras sencillas separadas): cuanto mayor es el contenido de G≡C, más alto es el punto de fusión del DNA. Ello es debido a que los pares de bases G≡C, con tres puentes de hidrógeno, requieren más energía calorífica para disociarse que los pares A═T. La medición del punto de fusión de una muestra de DNA, en condiciones de pH y fuerza iónica definidas, puede proporcionar una estimación de su composición en bases. Si se controlan con cuidado las condiciones de desnaturalización, las regiones ricas en pares A═T se desnaturalizarán específicamente, mientras que la mayor parte del DNA seguirá en forma de doble hebra. Estas regiones desnaturalizadas (denominadas burbujas) pueden observarse con el microscopio electrónico (**Fig. 8–28**). Observe que en la separación de las hebras del DNA que ha de tener lugar in vivo durante procesos tales como la replicación y la transcripción los sitios del DNA donde se inician estos procesos acostumbran a ser ricos en pares A═T.

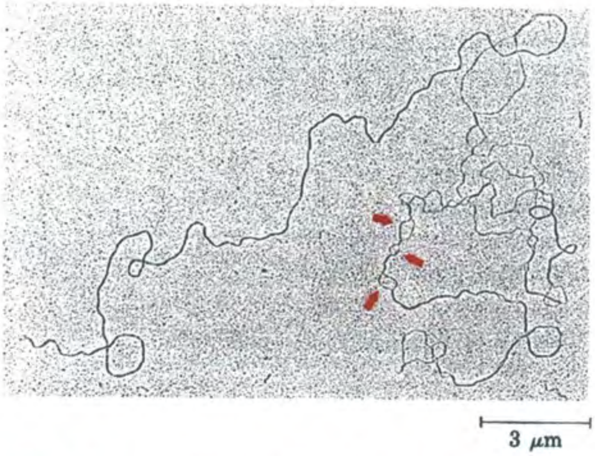


FIGURA 8–28 DNA parcialmente desnaturalizado. Este DNA fue parcialmente desnaturalizado y a continuación fijado para impedir su renaturalización durante la preparación de la muestra. El sombreado empleado para visualizar el DNA en esta micrografía aumenta su diámetro unas cinco veces e impide ver muchos detalles de la hélice. Sin embargo, pueden obtenerse medidas de longitud, y las regiones de cadena sencilla se distinguen fácilmente de las de cadena doble. Las flechas señalan algunas burbujas de cadena sencilla, donde se ha producido desnaturalización. Las regiones que se desnaturalizan son altamente reproducibles y son ricas en pares de bases A═T.

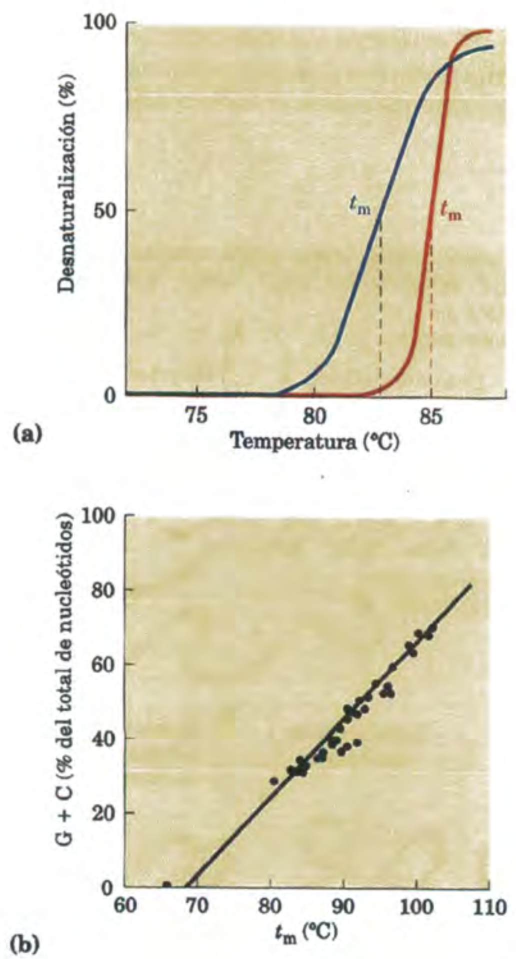


FIGURA 8–27 Desnaturalización térmica del DNA. (a) Desnaturalización o curva de fusión de dos muestras de DNA. La temperatura en el punto medio de la transición (t_m) es el punto de fusión; depende del pH, de la fuerza iónica y del tamaño y composición de bases del DNA. **(b)** Relación entre la t_m y el contenido de G+C de un DNA.

Los dúplex formados por dos hebras de RNA o por una de RNA y otra de DNA (híbridos RNA-DNA) también pueden desnaturalizarse. Un hecho notable es que los dúplex de RNA son más estables que los dúplex de DNA. A pH neutro, un RNA de doble hélice se desnaturaliza a una temperatura 20 °C o más por encima de la temperatura de desnaturalización de una molécula de DNA de secuencia comparable. La estabilidad de un híbrido RNA-DNA es normalmente intermedia entre la del RNA y la del DNA. Se desconoce la base física de estas diferencias de estabilidad.

Los ácidos nucleicos de especies diferentes pueden formar híbridos

La capacidad de dos hebras complementarias de DNA para aparearse entre sí puede ser aprovechada para detectar secuencias de DNA similares en dos especies diferentes o en el genoma de una misma especie. Si los dúplex de DNA aislados de células humanas y de ratón se desnaturalizan completamente por acción del calor y a continuación se mezclan y se mantienen a 25 °C por debajo de su t_m durante muchas horas, una gran parte del DNA se renaturalizará. La velocidad de renaturalización depende de la temperatura, la longitud y la concentración de los fragmentos de DNA, la concentración de

sales en la mezcla de reacción y las propiedades de la propia secuencia (por ejemplo, la complejidad y el contenido de G≡C). La temperatura es especialmente importante. Si la temperatura es demasiado baja, cortas secuencias que se parezcan a otras secuencias heterólogas de las moléculas de DNA hibridarán de forma improductiva, interfiriendo con el alineamiento más general de las hebras complementarias. Las temperaturas demasiado elevadas favorecen la desnaturalización. La mayor parte de las cadenas de DNA de ratón se unirán a cadenas complementarias de DNA de ratón; análogamente, la mayoría de moléculas de DNA humano se hibridarán con hebras humanas complementarias. Sin embargo, una parte de las moléculas del DNA de ratón se asociará con DNA humano para dar lugar a **dúplex híbridos,** en los cuales segmentos de una cadena de DNA de ratón estarán apareados con segmentos de DNA humano **(Fig. 8–29)**. Este fenómeno pone de manifiesto una herencia evolutiva común; diferentes organismos poseen generalmente un cierto número de proteínas y RNA con funciones similares y, a menudo, estructuras similares. En muchos casos, los DNA que codifican estas proteínas y estos RNA tienen secuencias similares. Cuanto más cercana sea la relación evolutiva entre las especies, mayor será el grado de hibridación de sus DNA. Por ejemplo, el DNA humano hibrida mucho más con el DNA de ratón que con el de levadura.

La hibridación de cadenas de DNA de orígenes diferentes es la base de un conjunto de poderosas técnicas, esenciales para la práctica de la genética molecular moderna. Es posible detectar un gen o una secuencia específica de DNA en presencia de otras muchas secuencias si se dispone de antemano de la hebra de DNA complementario adecuada (normalmente marcada de algún modo) que pueda hibridar con ella (Capítulo 9). El DNA complementario puede pertenecer a una especie diferente o a la misma especie; en algunos casos es sintetizado químicamente en el laboratorio, utilizando técnicas que se describen más adelante en este capítulo. Las técnicas de hibridación pueden modificarse para detectar un RNA específico en lugar de DNA. El aislamiento e identificación de genes y RNA específicos se basa en estas técnicas de hibridación. Estas tecnologías hace posible la identificación de un individuo a partir de un único cabello presente en la escena de un crimen o la predicción de la aparición de ciertas enfermedades en un individuo, décadas antes de que puedan apreciarse los primeros síntomas (véase el Recuadro 9–1).

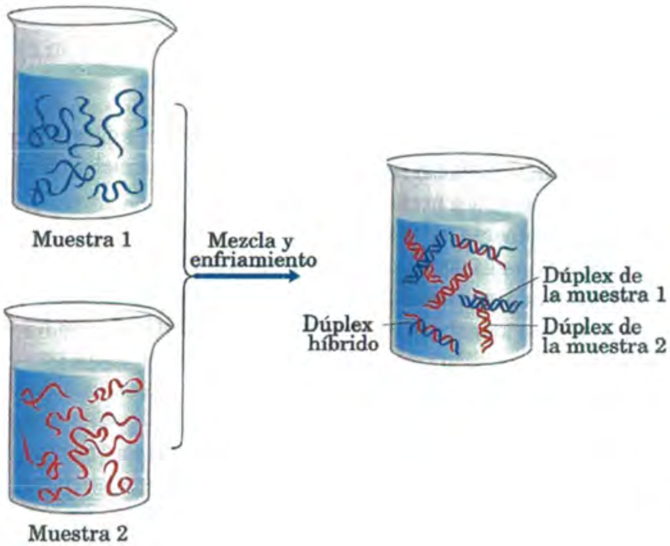


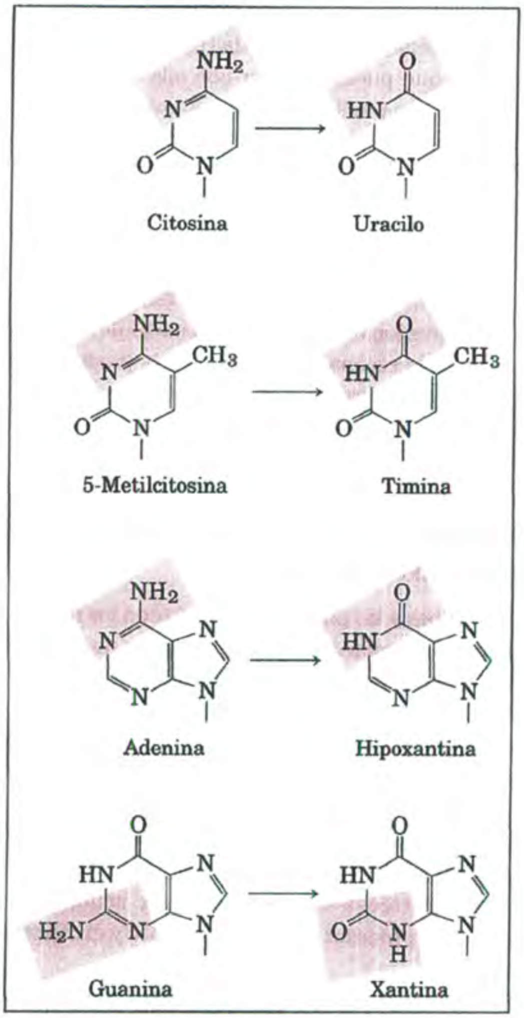
FIGURA 8–29 Hibridación del DNA. Dos muestras de DNA a comparar se desnaturalizan completamente por calor. Cuando las dos disoluciones se mezclan y se enfrían lentamente, las hebras de DNA de cada muestra se asocian con las hebras complementarias normales para formar dúplex. Si los dos DNA tienen secuencias que presentan una similitud significativa, también tienden a formar dúplex parciales o híbridos entre sí: cuanto más similares sean las secuencias de los dos DNA, mayor será el número de híbridos formados. La formación de híbridos puede medirse usando diferentes procedimientos. Generalmente, uno de los DNA está marcado con un isótopo radiactivo para simplificar las mediciones.

Los nucleótidos y los ácidos nucleicos experimentan transformaciones no enzimáticas

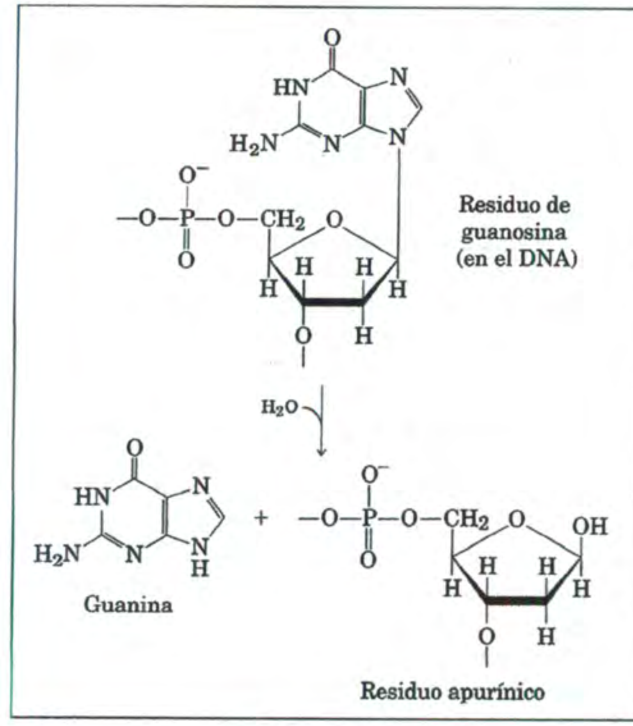
Las purinas y las pirimidinas, junto con los nucleótidos de los que forman parte, experimentan una serie de alteraciones espontáneas de su estructura covalente. Estas reacciones son normalmente *muy lentas*, pero resultan fisiológicamente significativas a causa de la muy baja tolerancia de la célula a alteraciones de su información genética. Las alteraciones en la estructura del DNA que dan lugar a cambios permanentes en la información genética codificada por la molécula se denominan **mutaciones.** Hay muchas pruebas a favor de una estrecha relación entre la acumulación de mutaciones y los procesos de envejecimiento y el cánceren un organismo.

Varias bases nucleotídicas sufren la pérdida espontánea de sus grupos amino exocíclicos (desaminación) **(Fig. 8–30a)**. Por ejemplo, en condiciones intracelulares típicas, la desaminación de una citosina (del DNA) para dar lugar a uracilo se produce en aproximadamente una de cada 10^7 residuos de citosina cada 24 h. Ello equivale, en promedio, a unas 100 mutaciones espontáneas por día en una célula de mamífero. La desaminación de la adenina y la guanina es aproximadamente 100 veces más lenta.

La lenta reacción de desaminación de la citosina parece inocua a primera vista, pero es casi con toda seguridad la causa de que el DNA contenga timina en lugar de uracilo. El producto de la desaminación de la citosina (uracilo) se reconoce rápidamente como extraño, y se elimina por un sistema de reparación (Capítulo 25). Si el DNA contuviera normalmente uracilo, el reconocimiento de los uracilos procedentes de la desaminación de la citosina sería más difícil, y los uracilos no reparados darían lugar a cambios permanentes en la secuencia al aparearse con adeninas en la replicación. La desaminación de la citosina provocaría entonces una disminución gradual en la cantidad de pares de bases G≡C y un aumento en los A═U en el DNA de todas las células. A lo largo de millones de años de evolución, la desaminación de la citosina podría acabar con los pares de bases G≡C y con el código genético que los utiliza. Es posible que la fijación de la timina como una de las cuatro bases del DNA haya sido un momento crucial de la evolución, que hizo posible el almacenamiento de la información genética a largo plazo.



(a) Desaminación



(b) Despurinación

FIGURA 8–30 Algunas reacciones no enzimáticas bien caracterizadas de los nucleótidos. **(a)** Reacciones de desaminación. Sólo se muestra la base. **(b)** Despurinación, en la cual se pierde una purina por hidrólisis del enlace *N*-β-glucosídico. La lesión resultante, en la que la desoxirribosa está presente pero no la base, se denomina sitio abásico o sitio AP (sitio apurínico o, raramente, sitio apirimidínico). La desoxirribosa restante después de la despurinación se convierte rápidamente de la forma β-furanósica a la forma aldehído (véase la Fig. 8–3). Otras reacciones no enzimáticas están ilustradas en las Figuras 8–31 y 8–32.

Otra reacción importante de los desoxirribonucleótidos es la hidrólisis del enlace *N*-β-glucosídico entre la base y la pentosa, que produce una lesión denominada sitio AP (apurínico, apirimidínico) o abásico (Fig. 8–30b). Esta reacción ocurre con mayor facilidad con las purinas que con las pirimidinas. En el DNA se pierde una de cada 10^5 purinas cada 24 h en condiciones celulares típicas (10.000 por célula de mamífero). La despurinación de los ribonucleótidos y del RNA es mucho más lenta y normalmente no se considera fisiológicamente significativa. En el laboratorio puede acelerarse la pérdida de purinas por tratamiento con ácido diluido. La incubación del DNA a pH 3 provoca la eliminación selectiva de las bases purínicas, y produce un derivado denominado ácido apurínico.

Otras reacciones están favorecidas por ciertos tipos de radiación. La luz UV puede inducir la condensación de dos grupos etileno para formar un anillo de ciclobutano. En la célula, la misma reacción entre bases pirimidínicas adyacentes da lugar a dímeros de pirimidina en ciclobutano. Estos se observan con mayor frecuencia entre residuos adyacentes de timina en la misma hebra del DNA **(Fig. 8–31)**. Un segundo tipo de dímero de pirimidina, llamado fotoproducto 6-4, también se forma durante la irradiación UV. Las radiaciones ionizantes (rayos X y rayos gamma) pueden provocar la abertura de los anillos y la fragmentación de las bases, así como roturas en el esqueleto covalente de los ácidos nucleicos.

Prácticamente todas las formas de vida están expuestas a la acción de radiaciones de alta energía, capaces de provocar cambios químicos en el DNA. La radiación en la región del UV cercano (con longitudes de onda entre 200 y 400 nm), que representa una porción significativa del espectro solar, puede producir la dimerización de las pirimidinas y otros cambios químicos en el DNA de las bacterias y de las células cutáneas en humanos. Estamos expuestos a un campo permanente de radiación ionizante en forma de rayos cósmicos, que pueden penetrar profundamente en la Tierra, así como a radiación emitida por elementos radiactivos como radio, plutonio, uranio, radón, ^{14}C y ^{3}H. Los rayos X utilizados en exámenes médicos o dentales o en radioterapia en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades son otra forma de radiación ionizante. Se estima que los UV y las radiaciones ionizantes son responsables de aproximadamente el 10% del total de lesiones en la estructura del DNA causados por agentes medioambientales.

El DNA también puede sufrir daños causados por reactivos químicos introducidos en el medio ambiente por la actividad industrial. Estos productos pueden no ser peligrosos en sí mis-

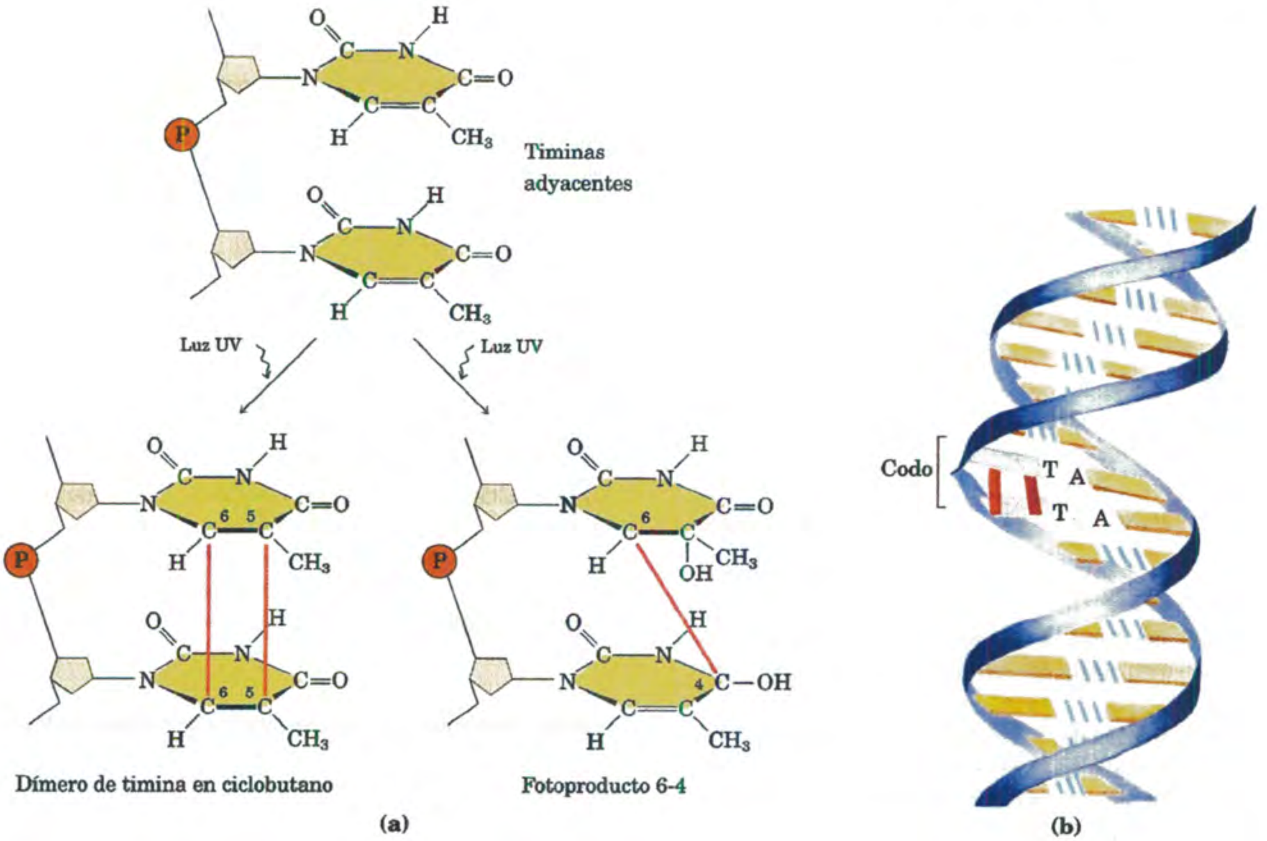
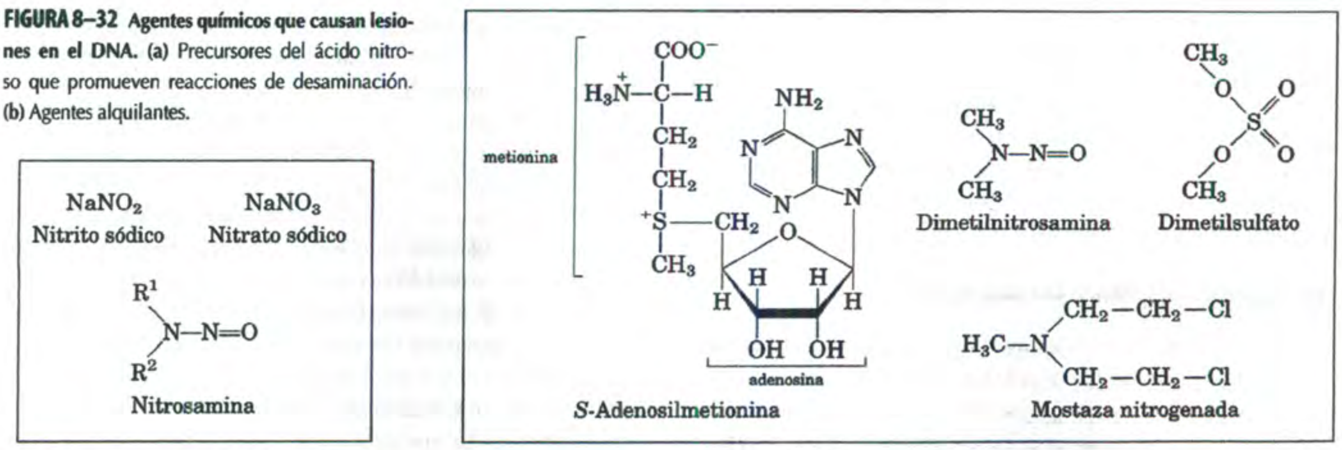


FIGURA 8–31 Formación de dímeros de pirimidina inducida por la luz UV. (a) Un tipo de reacción (a la izquierda) tiene como resultado la formación de un anillo de ciclobutilo en el que están involucrados los C-5 y C-6 de los residuos adyacentes de pirimidina. Una reacción alternativa (a la derecha) tiene como resultado un fotoproducto 6-4, con un enlace entre el C-6 de una pirimidina y el C-4 de la vecina. (b) La formación de un dímero de pirimidina de ciclobutano provoca una curva o codo en el DNA.

mos, pero su metabolización por las células puede convertirlos en productos que sí lo sean. Hay dos clases principales de este tipo de agentes (**Fig. 8–32**): (1) agentes desaminantes, en particular el ácido nitroso (HNO_2) o compuestos que pueden dar lugar a la formación metabólica de ácido nitroso o nitritos, y (2) agentes alquilantes.

El ácido nitroso, formado a partir de precursores orgánicos tales como nitrosaminas y sales de nitritos y nitrato, es un reactivo que acelera poderosamente la desaminación de las bases. El bisulfito tiene efectos similares. Ambos compuestos se usan como conservantes en alimentos preparados para evitar el crecimiento de bacterias tóxicas. Parece ser que su utilización no aumenta significativamente el riesgo de cáncer, probablemente porque las cantidades empleadas son pequeñas y su efecto sobre el DNA resulta despreciable. (Los riesgos potenciales para la salud a causa del deterioro que se produciría en los alimentos en el caso de que no se usaran estos conservantes son mucho mayores.)

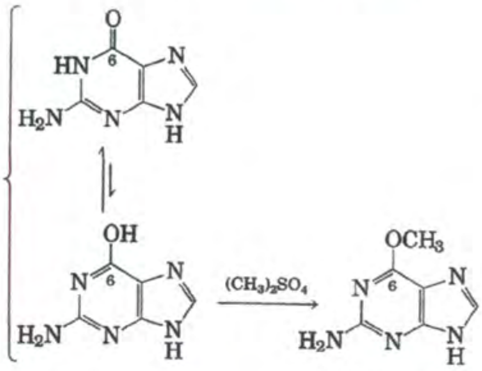
FIGURA 8–32 Agentes químicos que causan lesiones en el DNA. (a) Precursores del ácido nitroso que promueven reacciones de desaminación. (b) Agentes alquilantes.



(a) Precursores del ácido nitroso **(b) Agentes alquilantes**

Los agentes alquilantes pueden alterar ciertas bases del DNA. Por ejemplo, el compuesto dimetilsulfato, altamente reactivo (Fig. 8–32b), puede metilar la guanina y dar lugar a O^6-metilguanina, que no puede aparearse con la citosina.

Tautómeros de guanina



O^6-Metilguanina

Muchas reacciones similares son producidas por agentes alquilantes normalmente presentes en las células, como la *S*-adenosilmetionina.

La causa principal de alteraciones mutagénicas en el DNA son los procesos oxidativos. Las especies que contienen oxígeno reactivo, tales como el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo y los radicales superóxido, aparecen durante la irradiación o como productos secundarios del metabolismo aeróbico. De estas especies, los radicales hidroxilo son los responsables de una gran parte del daño oxidativo sobre el DNA. Las células poseen un elaborado sistema de defensa para destruir estas especies de oxígeno reactivas, del que forman parte enzimas tales como la catalasa y la superóxido dismutasa que convierten especies de oxígeno reactivas en productos inocuos. Sin embargo, una fracción de estos agentes oxidantes escapa inevitablemente a las defensas celulares y se producen lesiones en el DNA, que resultan de un conjunto amplio y complejo de reacciones que van desde la oxidación de la desoxirribosa y de las bases hasta la rotura de las hebras. Todavía no se dispone de estimaciones precisas del alcance de estas lesiones, pero está claro que el DNA de todas las células humanas está sometido cotidianamente a la acción de millares de reacciones oxidativas perjudiciales.

Lo que antecede es simplemente una muestra de las reacciones mejor conocidas que lesionan el DNA. Muchos compuestos cancerígenos presentes en la comida, el agua o el aire ejercen sus efectos a través de la modificación de las bases del DNA. Sin embargo, la integridad del DNA como polímero se mantiene mejor que la del RNA o de las proteínas, gracias a que el DNA es la única macromolécula que posee sistemas bioquímicos de reparación. Estos procesos de reparación (descritos en el Capítulo 25) amortiguan en gran medida el impacto de las lesiones en la estructura del DNA. ■

Algunas bases del DNA están metiladas

Algunas bases del DNA se metilan enzimáticamente. La adenina y la citosina se encuentran metiladas con más frecuencia que la guanina y la timina. La metilación está restringida generalmente a ciertas secuencias o regiones de la molécula de DNA. En algunos casos se conoce la función de la metilación; en otros es todavía desconocida. Todas las DNA-metilasas conocidas utilizan *S*-adenosilmetionina como dador de grupos metilo (Fig. 8–32b). *E. coli* dispone dos sistemas de metilación principales. Uno de ellos actúa como parte de un mecanismo de defensa celular que ayuda a distinguir el DNA propio con grupos metilo destruyendo el DNA sin grupos metilo (ajeno) (conocido como mecanismo de restricción-modificación; véase la p. 305). El otro sistema metila los residuos de adenosina en la secuencia (5′)GATC(3′), convirtiéndola en N^6-metiladenosina (Fig. 8–5a). Este proceso está catalizado por la Dam metilasa (*D*NA *a*denine *m*ethylation), que funciona como parte de un sistema de reparación de pares de bases incorrectos formados ocasionalmente durante la replicación del DNA (véase la Fig. 25–22).

En las células eucarióticas, aproximadamente el 5% de los residuos de citidina se encuentran metilados en forma de 5-metilcitidina (Fig. 8–5a). La metilación es muy frecuente en las secuencias CpG, lo que origina grupos metil-CpG simétricos en ambas hebras del DNA. El grado de metilación de las secuencias CpG varía en diferentes regiones de grandes moléculas de DNA eucariótico.

Es posible determinar la secuencia de largas cadenas de DNA

La propiedad más importante del DNA como depositario de la información genética es su secuencia de nucleótidos. Hasta finales de la década de 1970, determinar la secuencia de un ácido nucleico de tan sólo cinco o diez nucleótidos era una tarea difícil y laboriosa. El desarrollo de dos nuevas técnicas en el año 1977, una por Alan Maxam y Walter Gilbert y la otra por Frederick Sanger, hizo posible la secuenciación de moléculas de DNA muy largas con una facilidad inimaginable tan sólo unas pocas décadas atrás. Estas técnicas se desarrollaron gracias a una mejor comprensión de la química de los nucleótidos y del metabolismo del DNA y se basan en métodos electroforéticos que permiten la separación de hebras de DNA que difieren en tamaño en un solo nucleótido. La electroforesis de DNA es similar a la de proteínas (véase la Fig. 3–18). Frecuentemente se utiliza poliacrilamida como matriz de los geles en el análisis de DNA cortos (hasta unos centenares de nucleótidos); para la separación de DNA más largos normalmente se emplea agarosa.

Tanto en el método de Sanger como en el de Maxam y Gilbert, el principio general consiste en generar cuatro grupos de fragmentos marcados. La reacción que da lugar a cada uno de los grupos es específica de base, de manera que las longitudes de los fragmentos corresponden a posiciones de la secuencia del DNA donde se halla una base determinada. Por ejemplo, en el caso de un oligonucleótido de secuencia pAATCGACT, marcado en el extremo 5′ (el extremo de la izquierda), una reacción que corte el DNA después de cada C generará dos fragmentos marcados de cuatro y siete nucleótidos, mientras que una reacción que corte el DNA después de cada G tan sólo generará un fragmento marcado de cinco nucleótidos. Al estar los fragmentos marcados radiactivamente en el extremo 5′, sólo se observarán los fragmentos del lado 5′ del corte. Los tamaños de los fragmentos corresponden a las posiciones relativas de los residuos C y G en la secuencia. Cuando se separan por electroforesis en el mismo gel los grupos de fragmentos correspondientes a cada una de las cuatro bases, se produce un "escalonado" de bandas a partir del cual puede leerse directamente la

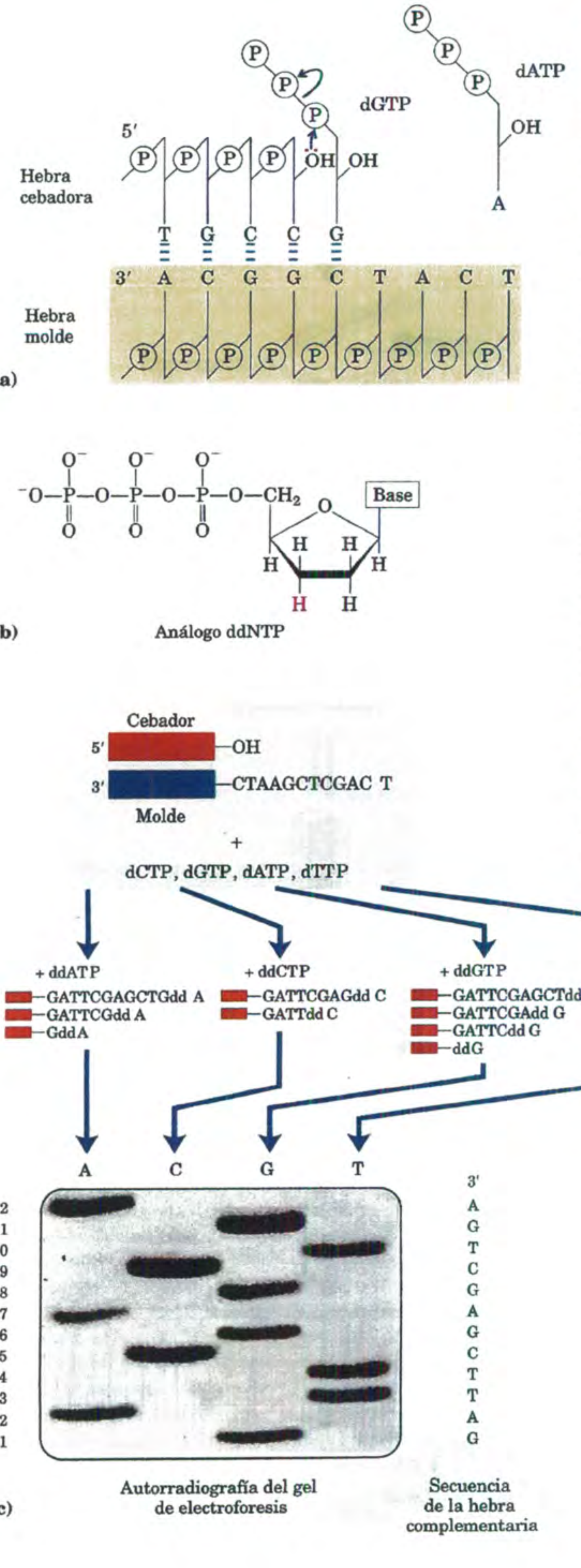


FIGURA 8–33 Secuenciación del DNA por el método de Sanger. Este método utiliza el mecanismo de síntesis de DNA por las DNA polimerasas (Capítulo 25). **(a)** Las DNA polimerasas requieren a la vez un cebador (un oligonucleótido corto) al que se añaden los nucleótidos y una hebra molde que dirije la selección de cada uno de los nuevos nucleótidos. En las células, el grupo hidroxilo en 3′ del cebador reacciona con el desoxinucleósido trifosfato entrante (dNTP), formando un nuevo enlace fosfodiéster. **(b)** El procedimiento de secuenciación de Sanger utiliza análogos del tipo didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) para interrumpir la síntesis del DNA. (El método de Sanger también es conocido como el método de los didesoxi.) Cuando se inserta un ddNTP en lugar de un dNTP se detiene la elongación de la cadena a causa de la ausencia del grupo hidroxilo en 3′ en el análogo, necesario para la siguiente reacción. **(c)** El DNA a secuenciar se utiliza como hebra molde y se hibrida con un cebador corto, marcado con radiactividad o con fluorescencia. Mediante la adición de pequeñas cantidades de un único ddNTP, por ejemplo ddCTP, a una reacción por lo demás normal, las hebras sintetizadas detendrán prematuramente su crecimiento en las posiciones en las que normalmente se encuentre dC. A consecuencia de la mayor cantidad de dCTP en relación a ddCTP, la probabilidad de que se incorpore el análogo en los casos en que deba incorporarse dC es pequeña. Sin embargo, la cantidad de ddCTP es suficientemente grande para asegurar que cada nueva hebra sintetizada incorpore al menos un ddC en algún punto durante la síntesis. El resultado es una disolución que contiene una mezcla de fragmentos marcados acabados en un residuo C. Cada residuo C en la secuencia genera un conjunto de fragmentos de una longitud determinada, de forma que el tamaño de los fragmentos, separados por electroforesis, indica la localización de los residuos C en la secuencia. Este procedimiento se repite separadamente para cada uno de los cuatro ddNTP, y la secuencia puede leerse directamente de un autorradiografía del gel. Los fragmentos de DNA más cortos migran a mayor velocidad, de manera que los más cercanos al extremo inferior del gel representan las posiciones de los nucleótidos más cercanos al cebador (extremo 5′) y la secuencia se lee de abajo arriba (en la dirección 5′ → 3′). Observe que la secuencia obtenida corresponde a la hebra *complementaria* de aquella que está siendo analizada.

secuencia de bases **(Fig. 8–33)**. Mostramos solamente el método de Sanger porque es de uso más general y es técnicamente más sencillo. Requiere la síntesis enzimática de una hebra de DNA complementaria de la hebra analizada, usando un "cebador" marcado radiactivamente y didesoxinucleótidos.

La secuenciación del DNA se realiza actualmente de modo automático, mediante una variante del método de Sanger, en la cual los didesoxinucleótidos utilizados en cada reacción están marcados con fluoróforos que emiten luz de diferente color **(Fig. 8–34)**. Esta tecnología permite obtener secuencias de miles de nucleótidos en unas pocas horas. Los genomas completos de más de un millar de organismos han sido secuenciados de esta manera (véase la Tabla 1–2) y muchos otros proyectos de secuenciación se encuentran en curso de realización. Por ejemplo, en el Proyecto Genoma Humano, se han secuenciado los tres mil doscientos millones de pares de bases del DNA de una célula humana (Capítulo 9).

Secuenciación del DNA por el método didesoxi

Se ha automatizado la síntesis química de DNA

Otra de las tecnologías que ha favorecido el progreso de la química de los ácidos nucleicos es la síntesis rápida y precisa de oligonucleótidos de cualquier secuencia. H. Gobind Khorana y colaboradores fueron los primeros en desarrollar la metodología en la década de 1970. El método más utilizado en la actualidad, denominado método de las fosforamiditas, fue desarrollado por Robert Letsinger y Marvin Caruthers **(Fig. 8–35)**. La síntesis se lleva a cabo con la cadena en crecimiento unida a un soporte sólido, y se basa en principios similares a los empleados por Merrifield para la síntesis de péptidos (véase la Fig. 3–29). La eficiencia de cada paso de adición es muy elevada, lo que hace posible sintetizar rutinariamente polímeros de 70 u 80 nucleótidos y, en algunos laboratorios, cadenas mucho más largas. La disponibilidad de polímeros de DNA con secuencias previamente diseñadas y a precios relativamente asequibles está teniendo un gran impacto en todas las áreas de la bioquímica (Capítulo 9).

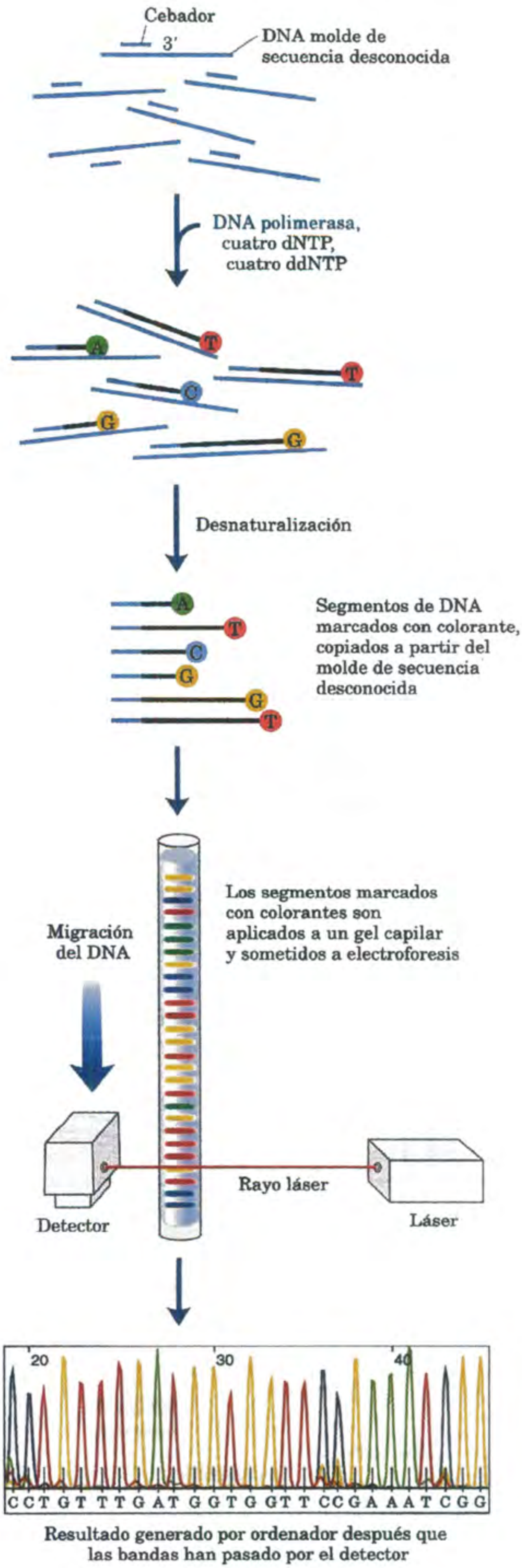


FIGURA 8–34 Una estrategia para la automatización de las reacciones de secuenciación del DNA. Cada didesoxinucleótido usado en el método de Sanger puede unirse a una molécula fluorescente que confiere a todos los fragmentos terminados en este nucleótido un color determinado. Los cuatro ddNTP se añaden a un único tubo. Los fragmentos de DNA coloreado resultantes se separan a continuación por tamaño mediante electroforesis en un único gel contenido en un tubo capilar (una modalidad electroforética que permite separaciones más rápidas). Todos los fragmentos de una longitud determinada migran a través del gel del capilar en un solo pico y el color asociado a cada una de ellos se detecta utilizando un rayo láser. La secuencia del DNA se lee a partir de la secuencia de los colores de los picos a medida que van pasando por el detector, y la información obtenida se envía directamente a un ordenador que determina la secuencia.

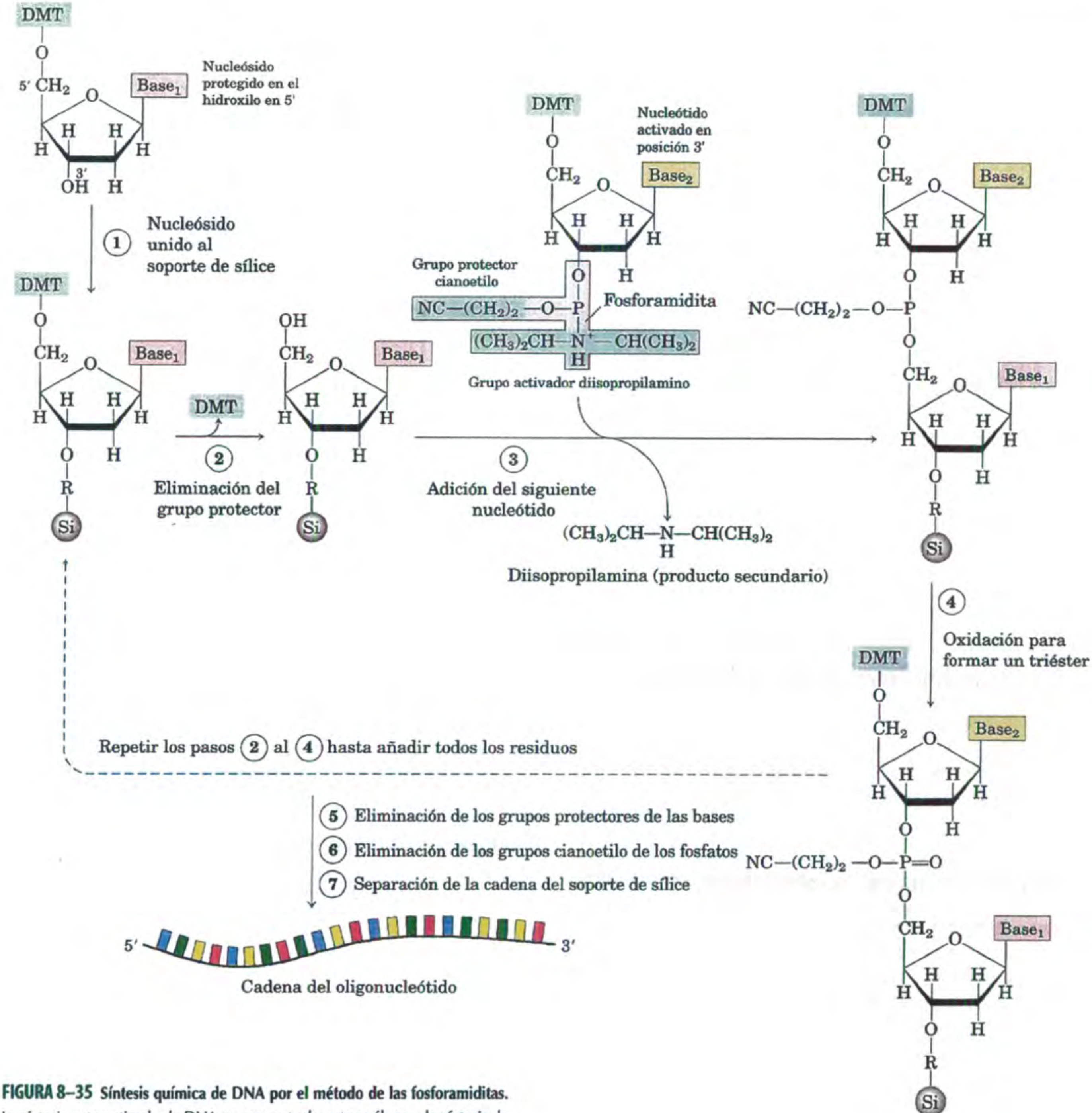


FIGURA 8–35 Síntesis química de DNA por el método de las fosforamiditas. La síntesis automatizada de DNA es conceptualmente análoga a la síntesis de polipéptidos en estado sólido. El oligonucleótido deseado se construye sobre un soporte sólido (sílice) nucleótido a nucleótido mediante la repetición de una serie de reacciones químicas con los precursores de los nucleótidos adecuadamente protegidos. (1) El primer nucleósido (que será el extremo 3') se une al soporte de sílice por el grupo 3' hidroxilo (a través de un grupo de unión, R), y su grupo hidroxilo en 5' está protegido por un grupo ácido lábil, dimetoxitritilo (DMT). Los grupos reactivos de las bases también están protegidos químicamente. (2) El grupo protector DMT es eliminado mediante lavado de la columna con ácido (el grupo DMT tiene color, de manera que la reacción puede seguirse espectrofotométricamente). (3) El siguiente nucleótido tiene una fosforamidita reactiva en su posición 3': un fosfito trivalente (a diferencia fosfato pentavalente más oxidado que se encuentra normalmente presente en los ácidos nucleicos) con uno de los oxígenos unidos reemplazado por un grupo amino o una amina sustituida. En la variante común, que es la que se muestra, uno de los oxígenos de la fosforamidita está unido a la desoxirribosa, otro está protegido con un grupo cianoetilo y el de la tercera posición está ocupado por un grupo diisopropilamina que se desplaza fácilmente. La reacción con el nucleótido inmovilizado forma un enlace 5',3' y el grupo diisopropilamina es eliminado. En el paso (4), la unión fosfito es oxidada con yodo para generar un enlace fosfotriéster. Las reacciones (2) a (4) se repiten hasta añadir todos los nucleótidos. En cada paso el exceso de nucleótido es eliminado con anterioridad a la adición del siguiente. En los pasos (5) a (6) se eliminan los grupos bloqueantes restantes de las bases y de los fosfatos, y en el paso (7) se separa el oligonucleótido del soporte sólido y se purifica. La química de la síntesis de RNA es algo más compleja a causa de la dificultad que entraña proteger el grupo hidroxilo en 2' de la ribosa sin que se produzcan efectos adversos en la reactividad del grupo hidroxilo en 3'.

RESUMEN 8.3 Química de los ácidos nucleicos

- El DNA nativo se desenrolla y sus hebras se separan reversiblemente (fusión) por efecto del calor o los pH extremos. Los DNA ricos en pares G≡C tienen temperaturas de fusión superiores a las del DNA rico en pares A═T.
- Los DNA de cadena sencilla de dos especies desnaturalizados pueden formar dúplex híbridos, cuyo grado de hibridación depende del grado de similitud de las secuencias. La hibridación es la base de importantes técnicas para el estudio y aislamiento de genes específicos y RNA.
- El DNA es un polímero relativamente estable. Reacciones espontáneas, tales como la desaminación de ciertas bases, la hidrólisis de los enlaces base-azúcar *N*-glucosídicos, la formación de dímeros de pirimidina inducida por radiación y el daño oxidativo, ocurren muy lentamente; sin embargo, son importantes por la baja tolerancia de las células a los cambios en el material genético.
- Se puede determinar la secuencia del DNA y se pueden sintetizar polímeros de DNA mediante determinada protocolos simples automatizados que incorporan métodos químicos y enzimáticos.

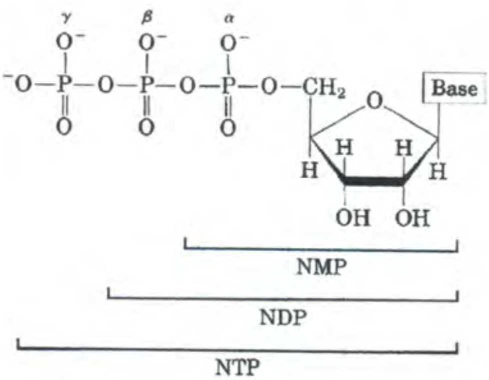
8.4 Otras funciones de los nucleótidos

Además de las funciones que les corresponden como subunidades de los ácidos nucleicos, los nucleótidos también desempeñan otras funciones en la célula: actúan como transportadores de energía, componentes de cofactores enzimáticos y mensajeros químicos.

Los nucleótidos transportan energía química en las células

Los nucleótidos pueden presentar uno, dos o tres grupos fosfato unidos covalentemente al grupo hidroxilo en 5′ de la ribosa. Se les conoce como nucleósidos mono-, di- y trifosfato, respectivamente **(Fig. 8–36)**. Partiendo de la ribosa, los grupos fosfato se suelen denominar α, β, y γ. La hidrólisis de los nucleósidos trifosfato proporciona la energía química para impulsar una amplia variedad de reacciones celulares. La adenosina 5′-trifosfato, ATP, es, con diferencia, el más ampliamente utilizado, aunque el UTP, el GTP y el CTP se emplean en algunas reacciones. Los nucleósidos trifosfato también actúan como precursores activados en la síntesis de DNA y RNA, tal como se verá en los Capítulos 25 y 26.

La hidrólisis del ATP y otros nucleósidos trifosfato libera energía como consecuencia de la estructura del grupo trifosfato. El enlace entre la ribosa y el fosfato es de tipo éster. Los enlaces α, β, y γ son anhídridos de ácido fosfórico **(Fig. 8–37)**. La hidrólisis del enlace éster libera aproximadamente 14 kJ/mol en condiciones estándar, mientras que la de cada uno de los enlaces anhídrido libera aproximadamente 30 kJ/mol. La hidrólisis del ATP a menudo juega un importante papel termodinámico en las biosíntesis. Cuando se acopla con una reacción que presenta una variación de energía libre positiva, la hidrólisis del ATP desplaza el equilibrio del proceso global en favor de la for-



Abreviaturas de los ribonucleósidos 5'-fosfato			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenina	AMP	ADP	ATP
Guanina	GMP	GDP	GTP
Citosina	CMP	CDP	CTP
Uracilo	UMP	UDP	UTP

Abreviaturas de los desoxirribonucleósidos 5'-fosfato			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenina	dAMP	dADP	dATP
Guanina	dGMP	dGDP	dGTP
Citosina	dCMP	dCDP	dCTP
Timina	dTMP	dTDP	dTTP

FIGURA 8–36 Nucleósidos fosfato. Estructura general de los nucleósidos 5′-mono, di- y trifosfato (NMP, NDP y NTP) y sus abreviaturas estándar. La pentosa es 2′-desoxi-D-ribosa en los desoxirribonucleósidos fosfato (dNMP, dNDP y dNTP).

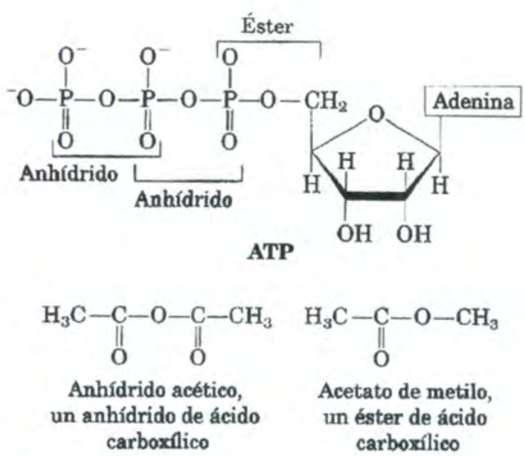


FIGURA 8–37 Los enlaces éster fosfato y anhídrido de ácido fosfórico del ATP. La hidrólisis de un enlace anhídrido libera más energía que la hidrólisis de un éster. Como comparación, se muestran un anhídrido y un éster de un ácido carboxílico.

mación de producto (recuérdese la relación entre la constante de equilibrio y la variación de energía libre descrita por la Ecuación 6-3 de la p. 188).

Los nucleótidos de adenina forman parte de muchos cofactores enzimáticos

Un buen número de cofactores enzimáticos que llevan a cabo una amplia gama de funciones químicas incluyen la adenosina como parte de su estructura **(Fig. 8–38)**. No tienen ninguna relación estructural entre ellos, aparte de la presencia de adenosina. En ninguno de ellos la porción de adenosina de la molécula participa directamente en su función primaria, pero si se elimina la adenosina de sus estructuras el resultado suele ser una drástica reducción de su actividad. Por ejemplo, la eliminación del nucleótido de adenina (3′-fosfoadenosina difosfato) del acetoacetil-CoA reduce su reactividad como sustrato de la β-cetoacil-CoA transferasa (un enzima del metabolismo lipídico) en un factor de 10^6. Aunque el papel de la adenosina no se ha estudiado en detalle, con seguridad tiene relación con la energía de unión entre el enzima y el sustrato (o cofactor), que está implicada tanto en la catálisis como en la estabilización del complejo enzima-sustrato inicial (Capítulo 6). En el caso de la β-cetoacil-CoA transferasa, la porción nucleotídica del CoA parece actuar como un "asidero" de fijación que ayuda a tirar del sustrato (acetoacetil-CoA) para colocarlo en el sitio activo. Es posible describir funciones parecidas para las porciones de nucleósido de otros cofactores nucleotídicos.

Podemos preguntarnos ¿por qué se usa adenosina en estas estructuras en lugar de otra molécula de gran tamaño? La respuesta puede estar relacionada con cuestiones de economía evolutiva. Ciertamente, la adenosina no es la única molécula que puede aportar una cantidad suficiente de energía potencial de unión. Es posible que la importancia de la adenosina radique, no

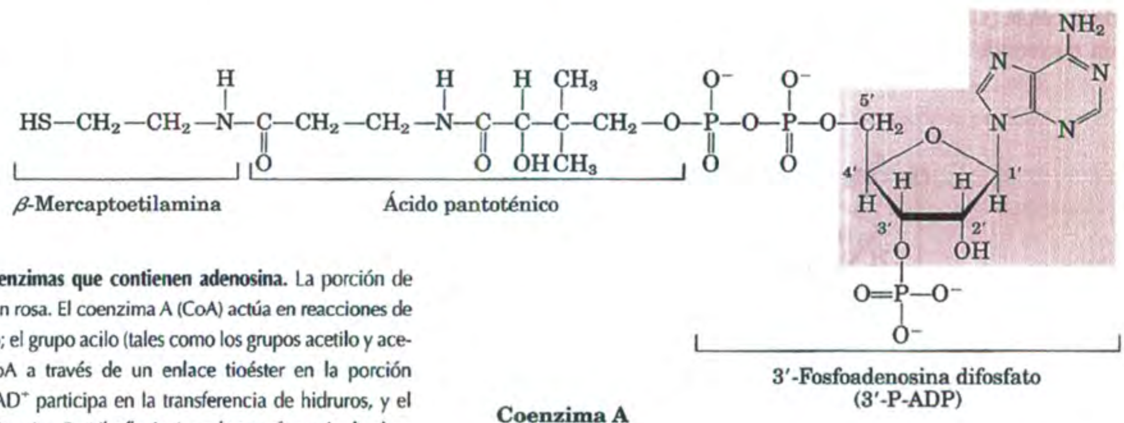
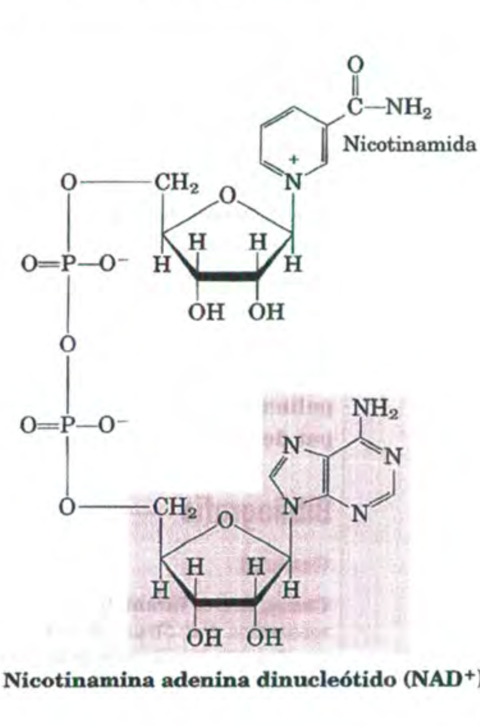
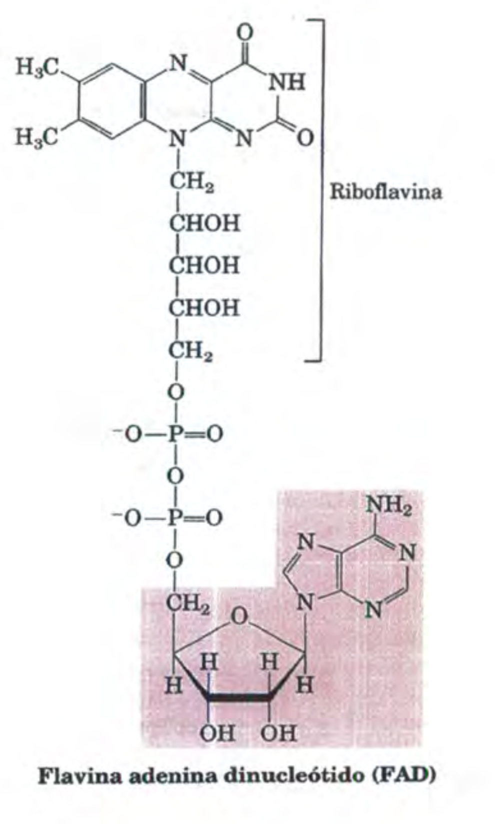


FIGURA 8–38 Algunos coenzimas que contienen adenosina. La porción de adenosina está sombreada en rosa. El coenzima A (CoA) actúa en reacciones de transferencia del grupo acilo; el grupo acilo (tales como los grupos acetilo y acetoacetilo) está unido al CoA a través de un enlace tioéster en la porción β-mercaptoetilamina. El NAD^+ participa en la transferencia de hidruros, y el FAD, la forma activa de la vitamina B_2 (riboflavina), en la transferencia de electrones. Otro coenzima que incorpora adenosina es la 5′-desoxiadenosil-cobalamina, la forma activa de la vitamina B_{12} (véase el Recuadro 17–2), que participa en las transferencias intramoleculares de grupos entre carbonos adyacentes.



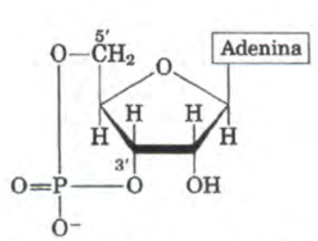


tanto en alguna característica química concreta, como en la ventaja evolutiva de usar un compuesto con múltiples funciones. Una vez el ATP se convirtió en la fuente universal de energía química, los sistemas evolucionaron para sintetizar ATP en mayor abundancia que otros nucleótidos; puesto que el ATP es abundante, resulta lógica su elección como parte de una amplia variedad de estructuras. La ganancia se hace extensiva a la estructura de las proteínas. Un solo dominio proteico capaz de fijar adenosina puede utilizarse en enzimas diferentes. Este tipo de estructura, denominada **plegamiento de unión de nucleótidos,** se encuentra en muchos enzimas que unen ATP y cofactores nucleotídicos.

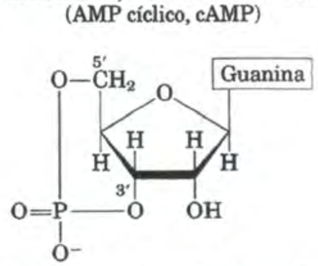
Algunos nucleótidos son moléculas reguladoras

Las células responden a su entorno captando señales hormonales u otras señales químicas exteriores. La interacción de estas señales químicas extracelulares ("primeros mensajeros") con los receptores de la superficie celular suele promover la producción de **segundos mensajeros** en el interior de la célula que, por su parte, provocan cambios adaptativos en el interior de la célula (Capítulo 12). El segundo mensajero es a menudo un nucleótido **(Figura 8–39)**. Uno de los más comunes es la **adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico (AMP cíclico** o **cAMP)**, que se forma a partir del ATP, en una reacción catalizada por la adenilil ciclasa, un enzima asociado a la cara interna de la membrana plasmática. El AMP cíclico tiene funciones reguladoras en prácticamente todas las células que no pertenezcan al reino vegetal. El nucleótido guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cGMP) se encuentra en muchas células y tiene también funciones reguladoras.

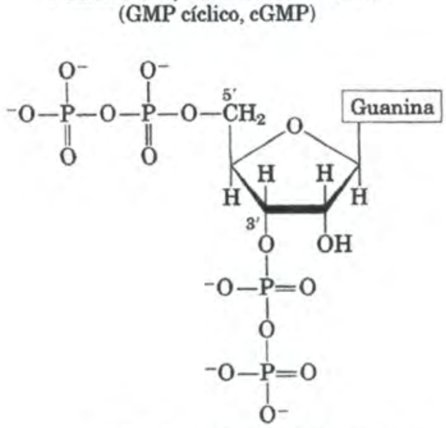
Otro nucleótido regulador, el ppGpp (Fig. 8–39), se produce en las bacterias como respuesta a la disminución de la síntesis proteica provocada una situación de carencia de aminoácidos del medio de cultivo. Este nucleótido inhibe la síntesis de las moléculas de rRNA y tRNA (véase la Fig. 28–24), necesarias para la síntesis proteica, evitando así la producción innecesaria de ácidos nucleicos.



Adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico
(AMP cíclico, cAMP)



Guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico
(GMP cíclico, cGMP)



Guanosina 5′-difosfato,3′-difosfato
(guanosina tetrafosfato)
(ppGpp)

FIGURA 8–39 Tres nucleótidos reguladores.

RESUMEN 8.4 Otras funciones de los nucleótidos

- El ATP es el portador central de energía química en las células. La presencia de la adenosina como parte de una variedad de cofactores enzimáticos puede estar relacionada con los requerimientos energéticos de la interacción.
- El AMP cíclico, formado a partir de ATP en una reacción catalizada por la adenilil ciclasa, es un segundo mensajero común producido en respuesta a hormonas u otras señales químicas.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

gen 271
RNA ribosómico (rRNA) 271
RNA mensajero (mRNA) 271
RNA de transferencia (tRNA) 271
nucleótido 271
nucleósido 272
pirimidina 272
purina 272
desoxirribonucleótido 273
ribonucleótido 273
enlace fosfodiéster 275
extremo 5′ 275
extremo 3′ 275
oligonucleótido 276
polinucleótido 276
par de bases 277
surco mayor 279
surco menor 279
forma B del DNA 281
forma A del DNA 281
forma Z del DNA 281
palíndromo 281
horquilla 281
cruciforme 281
DNA tríplex 282
tetráplex G 282
transcripción 284
mRNA monocistrónico 284
mRNA policistrónico 284
mutación 289
segundo mensajero 298
adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico (AMP cíclico, cAMP) 298

Bibliografía

General

Chang, K.Y. & Varani, G. (1997) Nucleic acids structure and recognition. *Nat. Struct. Biol.* **4** (Suppl.), 854–858.

Describe la aplicación de la RMN a la determinación de la estructura de los ácidos nucleicos.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., & Ellenberger, T. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd edn, ASM Press, Washington, DC.

Una buena fuente de información suplementaria sobre la química de los nucleótidos y los ácidos nucleicos.

Hecht, S.M. (ed.). (1996) *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*. Oxford University Press, Oxford.

Una muy útil colección de artículos.

Kornberg, A. & Baker, T.A. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn. W. H. Freeman and Company, New York.

El mejor punto de partida para profundizar en el estudio de la estructura del DNA.

Referencias históricas

Judson, H.F. (1996) *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*, expanded edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Olby, R.C. (1994) *The Path to the Double Helix: The Discovery of DNA*, Dover Publications, Inc., New York.

Sayre, A. (1978) *Rosalind Franklin and DNA*, W. W. Norton & Co., Inc., New York.

Watson, J.D. (1968) *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA*, Atheneum, New York. [Paperback edition, Touchstone Books, 2001.]

Variaciones de la estructura del DNA

Frank-Kamenetskii, M.D. & Mirkin, S.M. (1995) Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 65–95.

Herbert, A. & Rich, A. (1996) The biology of left-handed Z-DNA. *J. Biol. Chem.* **271**, 11,595–11,598.

Keniry, M.A. (2000) Quadruplex structures in nucleic acids. *Biopolymers* **56**, 123–146.

Excelente resumen de las propiedades de los cuadrúplex.

Moore, P.B. (1999) Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 287–300.

Shafer, R.H. (1998) Stability and structure of model DNA triplexes and quadruplexes and their interactions with small ligands. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**, 55–94.

Química de los ácidos nucleicos

Bonetta, L. (2006) Genome sequencing in the fast lane. *Nat. Methods* **3**, 141–147.

Se están desarrollando métodos más rápidos de secuenciación de ácidos nucleicos.

Collins, A.R. (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* **21**, 238–246.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., & Lunt J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* **17**, 1195–1214.

Marnett, L.J. & Plastaras, J.P. (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* **17**, 214–221.

El ATP como transportador de energía

Jencks, W.P. (1987) Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 65–73.

Un artículo relativamente corto, muy clarificador.

Problemas

1. Estructura de nucleótidos ¿Cuáles son las posiciones en un anillo de purina de un nucleótido purínico en el DNA que poseen el potencial para formar enlaces de hidrógeno, pero que no los forman en los pares de bases de Watson y Crick?

2. Secuencia de bases de hebras de DNA complementarias Una hebra de un DNA en doble hélice tiene la secuencia (5′)GCGCAATATTTCTCAAAATATTGCGC(3′). Escriba la secuencia de bases de la hebra complementaria. ¿Qué tipo especial de secuencia contiene este fragmento de DNA? ¿Puede la doble cadena formar estructuras alternativas?

3. El DNA del cuerpo humano Calcule el peso, expresado en gramos, de una molécula de DNA de doble hebra que se extendiera de la Tierra a la Luna (~320.000 km). La doble hélice de DNA pesa aproximadamente 1×10^{-18} g por cada 1.000 pares de nucleótidos; cada par de bases abarca 3.4 Å. Para establecer una comparación interesante, ¡piense que el cuerpo humano contiene aproximadamente 0,5 g de DNA!

4. Curvatura del DNA Suponga que un fragmento de poli(A) de cinco pares de bases produce una curvatura en una hebra del DNA de aproximadamente 20°. Calcule la curvatura total (neta) producida en el DNA si los pares de bases del centro (el tercero de cinco) de dos fragmentos sucesivos de $(dA)_5$ se sitúan a (a) 10 pares de bases o (b) 15 pares de bases de distancia. Suponga que hay 10 pares de bases por vuelta en la doble hélice del DNA.

5. Diferencias entre la estructura del DNA y la del RNA Las secuencias palindrómicas de RNA o DNA de cadena simple pueden formar estructuras en horquilla. ¿En qué se diferencian las estructuras helicoidales en horquilla del RNA y del DNA?

6. Química de los nucleótidos En las células de muchos organismos eucarióticos existen sistemas altamente especializados para reparar específicamente los errores de apareamiento G—T en el DNA. El error de apareamiento se repara creando un nuevo par de bases G≡C (no A═T). La reparación del apareamiento erróneo G—T actúa al mismo tiempo que un sistema más general que repara prácticamente todos los errores de apareamiento. ¿Puede proponer una razón para explicar que las células necesiten un sistema especializado para reparar los errores de apareamiento G—T?

7. Daño espontáneo en el DNA La hidrólisis del enlace *N*-glucosídico entre la desoxirribosa y una purina crea un sitio AP. Un sitio AP genera una desestabilización termodinámica mayor que la provocada por cualquier par de bases desapareado. Este efecto no está completamente explicado. Examine la estructura de un sitio AP (véase la Fig. 8–33b) y describa algunas consecuencias químicas de la pérdida de una base.

8. Estructura de los ácidos nucleicos Explique por qué aumenta la absorción de la luz UV por un DNA de doble hebra (efecto hipercrómico) al desnaturalizar el DNA.

9. Determinación de la concentración de proteína en una disolución que contiene proteínas y ácidos nucleicos La concentración de proteína o de ácido nucleico en una disolución que contenga ambos componentes puede estimarse aprovechando sus distintas propiedades de absorción de luz: las proteínas presentan una fuerte absorción a 280 nm, mientras que los ácidos nucleicos absorben la luz con más intensidad a 260 nm. Cuando en una disolución se hallan presenten proteínas y ácidos nucleicos, es posible estimar sus concentraciones respectivas midiendo la absorbancia (A) de la disolución a 280 nm y a 260 nm, con ayuda de la tabla de la página 300. La tabla indica el porcentaje de la masa total que corresponde al ácido nucleico en función de $R_{280/260}$, la relación de absorbancias a 280 y 260 nm. El factor F permite corregir la lectura de A_{280} para obtener una mejor estimación de la concentración de proteína. La concentración de proteína (en

mg/mL) es igual a $F \times A_{280}$ (suponiendo que la cubeta tenga 1 cm de paso de luz). Calcule las concentraciones de proteína y de ácido nucleico si $A_{280} = 0{,}69$ y $A_{260} = 0{,}94$.

$R_{280/260}$	Proporción de ácido nucleico (%)	F
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

10. Solubilidad de los componentes del DNA Dibuje las siguientes estructuras y ordénelas según su solubilidad relativa en agua (de más soluble a menos soluble): desoxirribosa, guanina, fosfato. ¿Por qué estas solubilidades están en consonancia con la estructura tridimensional del DNA de doble cadena?

11. Fundamento de la secuenciación por el método de Sanger En el método de Sanger (didesoxi) para secuenciar DNA, se añade una pequeña cantidad de didesoxinucleótido trifosfato, supongamos ddCTP, a la reacción de secuenciación junto con una cantidad mayor del correspondiente dCTP ¿Qué resultado se observaría si se omitiera el dCTP?

12. Secuenciación del DNA El siguiente fragmento de DNA fue secuenciado por el método de Sanger. El asterisco representa un marcador fluorescente.

*5′ ——— 3′-OH
3′ ——— ATTACGCAAGGACATTAGAC---5′

Una muestra de DNA fue tratada con una DNA polimerasa y con cada una de las mezclas de nucleótidos (en un tampón apropiado) indicadas a continuación. Los didesoxinucleótidos (ddNTP) fueron añadidos en cantidades relativamente pequeñas.

1. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddTTP
2. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddGTP
3. dATP, dCTP, dGTP, ddTTP
4. dATP, dTTP, dCTP, dGTP

El DNA resultante se separó por electroforesis en gel de agarosa y se localizaron las bandas fluorescentes. Se muestra el patrón de bandas obtenido con la mezcla de nucleótidos 1. Suponiendo que todas las mezclas fuesen analizadas en el mismo gel, ¿qué apariencia tendrían los restantes carriles?

13. Fosfodiesterasa de veneno de serpiente Una exonucleasa es un enzima que separa nucleótidos de forma secuencial a partir del extremo de una cadena polinucleotídica. La fosfodiesterasa de veneno de serpiente, que hidroliza nucleótidos desde el extremo 3′ de cualquier oligonucleótido que tenga un grupo 3′ hidroxilo libre, rompe entre el 3′ hidroxilo de la ribosa o desoxirribosa y el grupo fosforilo del siguiente nucleótido. Actúa tanto sobre DNA de cadena sencilla como sobre RNA y no presenta especificidad de base. Este enzima se utilizó en la determinación de secuencias antes del desarrollo de las técnicas modernas de secuenciación de ácidos nucleicos. ¿Cuáles son los productos de la digestión parcial por la fosfodiesterasa de veneno de serpiente de un oligonucleótido con la siguiente secuencia?

(5′)GCGCCAUUGC(3′)—OH

14. Conservación del DNA en endosporas bacterianas Las endosporas bacterianas se forman cuando el ambiente ya no es adecuado para el mantenimiento del metabolismo celular. La bacteria del suelo, *Bacillus subtilis*, por ejemplo, empieza el proceso de esporulación cuando se han agotado uno o más nutrientes. El producto final es una pequeña estructura metabólicamente inactiva que puede sobrevivir casi indefinidamente sin metabolismo detectable. Las esporas tienen mecanismos para impedir la acumulación de mutaciones potencialmente letales en su DNA durante períodos de latencia superiores a los 1.000 años. Las esporas de *B. subtilis* son mucho más resistentes al calor, radiación UV y agentes oxidantes, todos los cuales provocan mutaciones, que las células en crecimiento.

(a) Un factor que impide la lesión potencial del DNA en las esporas, es la gran disminución de su contenido en agua. ¿De qué modo afectaría la deshidratación a algunos tipos de mutaciones?

(b) Las endosporas contienen una clase de proteínas denominadas pequeñas proteínas ácido-solubles (SASP) que se unen a su DNA impidiendo la formación de dímeros de tipo ciclobutano. ¿Qué produce los dímeros de ciclobutano y por qué las endosporas necesitan mecanismos para impedir su formación?

15. Síntesis de oligonucleótidos En el esquema de la Figura 8-35, se modifica cada nueva base que tiene que añadirse al oligonucleótido en crecimiento para activar su 3′ hidroxilo y el 5′ hidroxilo tiene unido un grupo dimetoxitritilo (DMT). ¿Cuál es la función del grupo DMT de la base entrante?

Bioquímica en Internet

16. Estructura del DNA El descubrimiento de la estructura tridimensional del DNA ayudó a los investigadores a comprender de qué modo esta molécula transmite información que se puede replicar fielmente de una generación a la siguiente. Para ver la estructura secundaria del DNA vaya al sitio Web del Protein Data Bank (www.rcsb.org). Utilice los identificadores del PDB indicados más adelante para bajar las páginas de datos estructurales de las dos formas de DNA.

Abra las estructuras utilizando Jmol (conectado en Display Options) y utilice los controles en el menú de Jmol (se accede con un clic de control o clicando sobre el logo de Jmol en el ángulo inferior derecho de la pantalla) para completar los ejercicios siguientes. Consulte las conexiones de ayuda de Jmol cuando lo necesite.

(a) Obtenga el archivo de 141D, que contiene una secuencia de DNA altamente conservada del extremo del genoma del VIH-1 (el virus causante del sida). Muestre la molécula en forma de estructura de bolas y varas (en el menú control, escoja Seleccionar > Todo, a continuación Representar > Esquema > Bolas y Varas). Identifique el armazón azúcar-fosfato de cada cadena del dúplex de DNA. Localice e identifique las bases individuales. ¿Cuál es el extremo 5′ de cada hebra? Localice los surcos mayor y menor. ¿Se trata de una hélice dextrógira o levógira?

(b) Obtenga el archivo 145D correspondiente al DNA en la conformación Z. Muestre la molécula en forma de estructura de bolas y varas. Identifique el armazón azúcar-fosfato de cada cadena del dúplex de DNA. ¿Se trata de una hélice dextrógira o levógira?

(c) Para apreciar en su totalidad la estructura secundaria del DNA seleccione la opción de visión "Stereo". En el menú de control, Seleccione > Todo, a continuación Obtener > Estereográfico > Bizco (cross-eyed) o Visión desviada (wall-eyed). Verá dos imágenes de la molécula de DNA. Permanezca sentado con su nariz a unos 25 cm aproximadamente de la pantalla y enfoque la vista en la punta de su nariz (bizco) o en los bordes opuestos de la pantalla (visión desviada).

En el fondo tendría que ver tres imágenes de la hélice de DNA. Desplace el enfoque a la imagen central, que debería aparecer en forma tridimensional.

Problema de análisis de datos

17. Estudios de Chargaff de la estructura del DNA La sección "El DNA es una doble hélice que almacena información genética" incluye un resumen de los hallazgos principales de Erwin Chargaff y sus colaboradores en forma de cuatro conclusiones ("Reglas de Chargaff", p. 278). En este problema examinará los datos obtenidos por Chargaff que apoyan estas conclusiones.

En un artículo, Chargaff (1950) describió sus métodos analíticos y sus resultados iniciales. De forma resumida, trató muestras de DNA con ácido para eliminar las bases, separó las bases por cromatografía en papel y midió la cantidad de cada base por espectroscopia al UV. Sus resultados se muestran en las siguientes tres tablas.

La *relación molar* es la relación entre el número de moles de cada base en la muestra y el número de moles de fosfato en la muestra, que corresponde a la fracción del número total de bases representada por cada base en particular. La *recuperación* es la suma de las cuatro bases (la suma de las relaciones molares); la recuperación completa de todas las bases del DNA daría una recuperación de 1,0.

Relaciones molares en el DNA de buey

	Timo			Bazo		Hígado
Base	**Prep. 1**	**Prep. 2**	**Prep. 3**	**Prep. 1**	**Prep. 2**	**Prep. 1**
Adenina	0,26	0,28	0,30	0,25	0,26	0,26
Guanina	0,21	0,24	0,22	0,20	0,21	0,20
Citosina	0,16	0,18	0,17	0,15	0,17	
Timina	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24	
Recuperación	*0,88*	*0,94*	*0,94*	*0,84*	*0,88*	

Relaciones molares en el DNA humano

	Esperma		Timo	Hígado	
Base	**Prep. 1**	**Prep. 2**	**Prep. 1**	**Normal**	**Carcinoma**
Adenina	0,29	0,27	0,28	0,27	0,27
Guanina	0,18	0,17	0,19	0,19	0,18
Citosina	0,18	0,18	0,16		0,15
Timina	0,31	0,30	0,28		0,27
Recuperación	*0,96*	*0,92*	*0,91*		*0,87*

Relaciones molares en el DNA de microorganismos

	Levadura		Bacilo tuberculoso aviar
Base	**Prep. 1**	**Prep. 2**	**Prep. 1**
Adenina	0,24	0,30	0,12
Guanina	0,14	0,18	0,28
Citosina	0,13	0,15	0,26
Timina	0,25	0,29	0,11
Recuperación	*0,76*	*0,92*	*0,77*

(a) Sobre la base de estos datos, Chargaff concluyó que "hasta ahora no se han encontrado diferencias de composición en el DNA de diferentes tejidos de la misma especie". Ello está de acuerdo con la conclusión 2 de este capítulo. Sin embargo, una mirada escéptica a los datos anteriores podría llevar a afirmar, "¡A mí me parecen diferentes!" Si fuese Chargaff, ¿cómo utilizaría estos datos para convencer a un escéptico de cambiar de opinión?

(b) La composición en bases del DNA de células normales y cancerosas de hígado (hepatocarcinoma) no era significativamente distinta. ¿Esperaría que la técnica de Chargaff fuese capaz de detectar diferencias entre el DNA normal y el de las células cancerosas? Explique su razonamiento.

Como puede suponer, los datos de Chargaff no eran del todo convincentes. Continuó mejorando sus técnicas, como se describe en un artículo posterior (Chargaff, 1951), en el cual se determinan las relaciones molares de las bases del DNA de una variedad de organismos:

Origen	A:G	T:C	A:T	G:C	Purina:pirimidina
Buey	1,29	1,43	1,04	1,00	1,1
Humano	1,56	1,75	1,00	1,00	1,0
Gallina	1,45	1,29	1,06	0,91	0,99
Salmón	1,43	1,43	1,02	1,02	1,02
Trigo	1,22	1,18	1,00	0,97	0,99
Levadura	1,67	1,92	1,03	1,20	1,0
Haemophilus influenzae tipo c	1,74	1,54	1,07	0,91	1,0
E. coli K-12	1,05	0,95	1,09	0,99	1,0
Bacilo tuberculoso aviar	0,4	0,4	1,09	1,08	1,1
Serratia marcescens	0,7	0,7	0,95	0,86	0,9
Bacillus schatz	0,7	0,6	1,12	0,89	1,0

(c) Según Chargaff, como se afirma en la conclusión 1 de este capítulo, "La composición de bases del DNA generalmente varía de una especie a otra". Argumente, sobre la base de los datos presentados hasta ahora, a favor de esta conclusión.

(d) De acuerdo con la conclusión 4, "En *todos* los DNA celulares, con independencia de la especie... A + G = T + C". Argumente, sobre la base de los datos presentados hasta ahora, a favor de esta conclusión.

Chargaff pretendía descalificar la "hipótesis del tetranucleótido", según la cual el DNA era un polímero del tetranucleótido $(AGCT)_n$ repetido monótonamente y por lo tanto incapaz de contener información asociada a la secuencia. Aunque los datos presentados anteriormente muestran que el DNA no puede consistir en un simple tetranucleótido —si así fuese todas las muestras tendrían relaciones molares de 0,25 para cada base— todavía era posible que el DNA de diferentes organismos fuese ligeramente más complejo, pero basado en la repetición monótona de una secuencia.

Para abordar este problema, Chargaff tomó DNA de germen de trigo y lo trató con desoxirribonucleasa a diferentes intervalos de tiempo. El tamaño del DNA disminuía en función del tiempo de digestión; a los fragmentos más largos sin digerir los denominó el "núcleo". En la tabla que sigue, el "núcleo 19%" corresponde a los fragmentos mayores restantes una vez se ha degradado el 81% del DNA; el "núcleo 8%" corresponde a los fragmentos mayores después de la degradación del 92% del DNA.

Base	DNA intacto	Núcleo 19%	Núcleo 8%
Adenina	0,27	0,33	0,35
Guanina	0,22	0,20	0,20
Citosina	0,22	0,16	0,14
Thimina	0,27	0,26	0,23
Recuperación	*0,98*	*0,95*	*0,92*

(e) ¿Cómo utilizaría estos datos para argumentar que el DNA de germen de trigo no está formado por una secuencia repetida monótonamente?

Referencias

Chargaff, E. (1950) Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymic degradation. *Experientia* **6**, 201–209.

Chargaff, E. (1951) Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.* **10**, 654–659.

9

> De todos los sistemas naturales, la materia viva es el que, frente a grandes transformaciones, conserva en su organización una parte más considerable de su pasado histórico.
>
> —*Emile Zuckerkandl y Linus Pauling, artículo en el* Journal of Theoretical Biology, *1965*

Tecnologías de la información basadas en el DNA

En este capítulo nos ocupamos de una tecnología fundamental para el progreso de la biología moderna, la definición de las presentes y futuras fronteras de la bioquímica y la explicación de muchos principios importantes de la bioquímica. El descubrimiento de las leyes que gobiernan la catálisis enzimática, las estructuras macromoleculares, el metabolismo celular y las rutas de la información permiten que la investigación afronte procesos bioquímicos cada vez más complejos. La división celular, la inmunidad, la embriogénesis, la visión, el gusto, la oncogénesis, la percepción, son procesos orquestados por un conjunto de interacciones moleculares y macromoleculares cada vez mejor conocidas. Las verdaderas implicaciones de la exploración bioquímica emprendida en el siglo XIX hay que buscarlas en la cada vez mayor capacidad para comprender y modificar los sistemas vivos.

La metodología bioquímica para comprender un proceso biológico complejo consiste en el aislamiento y estudio in vitro de sus componentes individuales, para después juntar las distintas partes con la intención de lograr una visión coherente de la totalidad del proceso. Una de las principales fuentes de información sobre los procesos moleculares es el propio archivo de información de la célula, su DNA. Sin embargo, el gran tamaño de los cromosomas celulares constituye un enorme desafío: ¿cómo se puede encontrar y estudiar un gen particular ente las decenas de millares de genes distribuidos entre los miles de millones de pares de bases del genoma de un mamífero? Las soluciones empezaron a vislumbrarse en la década de 1970.

Décadas de esfuerzos de miles de científicos, trabajando en genética, bioquímica, biología celular y química física, se materializaron finalmente en los laboratorios de Paul Berg, Herbert Boyer y Stanley Cohen, quienes idearon técnicas para la localización, el aislamiento, la preparación y el estudio de pequeños segmentos de DNA procedentes de cromosomas mucho mayores. Las técnicas para la clonación del DNA han hecho posibles la **genómica** y la **proteómica** modernas; es decir, el estudio de los genes y las proteínas a nivel celular y de los organismos enteros. Estos nuevos métodos están transformando la investigación básica, la agricultura, la medicina, la ecología, la medicina forense y muchos otros campos, y al mismo tiempo han planteado a la sociedad desconcertantes alternativas y difíciles dilemas éticos.

Comenzamos este capítulo con la descripción de los principios bioquímicos fundamentales de la ya clásica disciplina de la clonación de DNA. A continuación ilustramos todo el abanico de aplicaciones y las potencialidades de estas nuevas tecnologías, con especial énfasis en los avances actuales de la genómica y la proteómica.

Paul Berg

Herbert Boyer

Stanley N. Cohen

9.1 Clonación del DNA: fundamentos

Un *clon* es una copia idéntica. Este término se aplicó originalmente al aislamiento y reproducción de una célula para crear una población de células idénticas. La **clonación del DNA** comporta la separación de un gen específico o de un fragmento de DNA de un cromosoma mucho mayor y su unión a una pequeña molécula de DNA portador, para después replicar este DNA modificado miles o millones de veces, como efecto a la vez del aumento del número de células del huésped y de la creación de múltiples copias del DNA clonado en cada célula. El resultado es la amplificación selectiva de un gen o de un segmento de DNA particular. La clonación del DNA de cualquier organismo consta de cinco etapas principales:

1. *Cortar el DNA en lugares precisos.* Las endonucleasas específicas de secuencia (endonucleasas de restricción) hacen las veces de tijeras moleculares.
2. *Selección de una pequeña molécula de DNA capaz de autorreplicarse.* Estos DNA se denominan **vectores de clonación** (un vector es un agente de entrega). Normalmente se trata de plásmidos o de DNA víricos.
3. *Unión covalente de dos fragmentos de DNA.* El enzima DNA ligasa une el vector de clonación y el DNA que se desea clonar. Las moléculas de DNA compuestas de segmentos unidos covalentemente, procedentes de dos o más fuentes, se denominan **DNA recombinantes.**
4. *Traslado del DNA del tubo de ensayo a una célula huésped,* que proporcionará la maquinaria enzimática necesaria para la replicación del DNA.
5. *Selección o identificación de las células huésped que contienen el DNA recombinante.*

Los métodos empleados para llevar a cabo estas tareas, y otras relacionadas, se denominan colectivamente **tecnología del DNA recombinante** o, más informalmente, **ingeniería genética.**

En esta discusión inicial, nos centraremos en la clonación de DNA en la bacteria *Escherichia coli*, que fue el primer organismo utilizado en el trabajo con DNA recombinante y que todavía es la célula huésped más común. *E. coli* tiene muchas ventajas: se conoce bastante bien el metabolismo de su DNA (y muchos otros de sus procesos bioquímicos), muchos vectores de clonación que se encuentran asociados de manera natural con *E. coli*, tales como plásmidos y bacteriófagos (virus bacterianos, también denominados fagos), están bien caracterizados, y se dispone de técnicas efectivas para la transferencia de DNA de una bacteria a otra. Posteriormente, en este capítulo trataremos de la clonación de DNA en otros organismos ya que los principios aquí discutidos son ampliamente aplicables a la clonación del DNA en general.

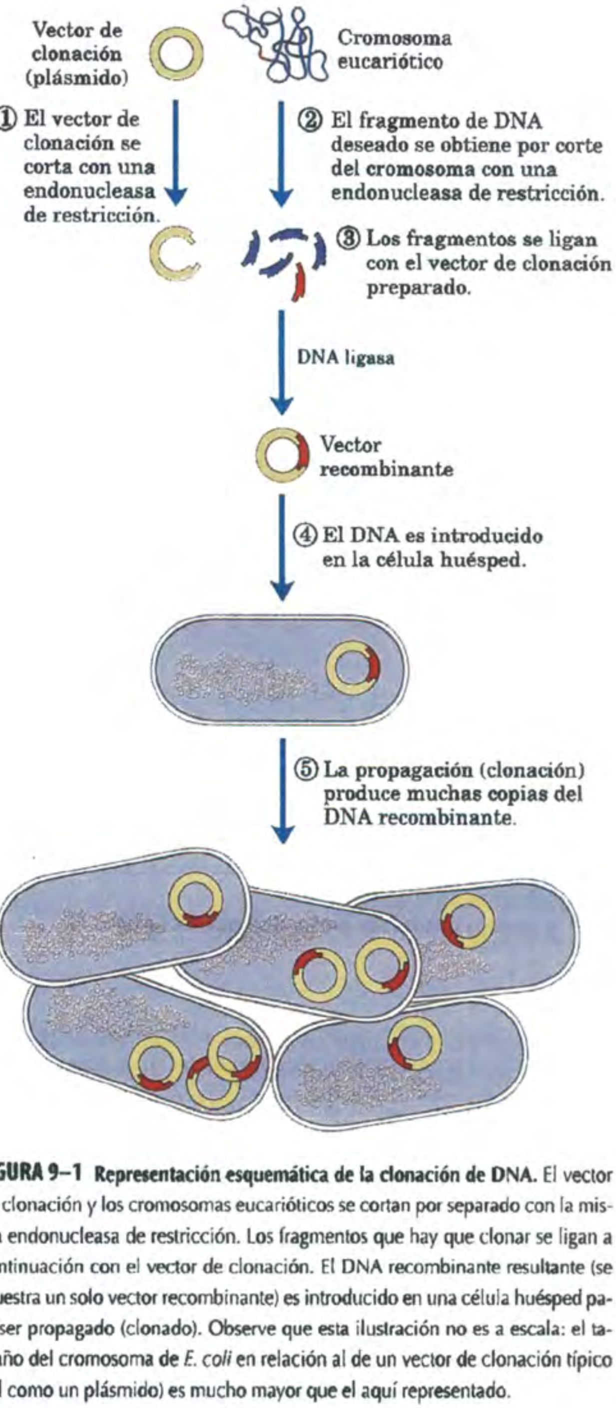


FIGURA 9–1 Representación esquemática de la clonación de DNA. El vector de clonación y los cromosomas eucarióticos se cortan por separado con la misma endonucleasa de restricción. Los fragmentos que hay que clonar se ligan a continuación con el vector de clonación. El DNA recombinante resultante (se muestra un solo vector recombinante) es introducido en una célula huésped para ser propagado (clonado). Observe que esta ilustración no es a escala: el tamaño del cromosoma de *E. coli* en relación al de un vector de clonación típico (tal como un plásmido) es mucho mayor que el aquí representado.

El DNA recombinante se obtiene mediante endonucleasas de restricción y DNA ligasa

Un conjunto de enzimas, disponibles gracias a décadas de investigación del metabolismo de los ácidos nucleicos, es importante para la tecnología del DNA recombinante (Tabla 9–1). En la base de la metodología para producir y propagar una molécula de DNA recombinante se encuentran dos tipos de enzimas (**Fig. 9–1**). Primero, las **endonucleasas de restricción** (también denominadas enzimas de restricción) reconocen y cortan el DNA en secuencias específicas (secuencias de reconocimiento o sitios de restricción), generando una serie de fragmentos más pequeños. Segundo, el fragmento de DNA que debe clonarse se une a un vector de clonación adecuado mediante **DNA ligasas,** que empalman las moléculas de DNA. El vector recombinante es introducido en una célula huésped, que amplifica el fragmento a lo largo de muchas divisiones celulares.

Las endonucleasas de restricción se encuentran en muchas especies bacterianas. Werner Arber descubrió que su función biológica es reconocer y cortar DNA foráneo (p. ej., el DNA de un virus infeccioso); se dice que este DNA está *restringido*. En el DNA de la célula huésped, la secuencia reconocida por la pro-

TABLA 9–1 Algunos enzimas utilizados en la tecnología del DNA recombinante

Enzima(s)	Función
Endonucleasas de restricción de tipo II	Corta el DNA en secuencias específicas
DNA ligasa	Une dos moléculas o fragmentos de DNA
DNA polimerasa I (*E. coli*)	Rellena huecos en el DNA dúplex por adición secuencial de nucleótidos en los extremos 3′
Transcriptasa inversa	Hace una copia de DNA a partir de una molécula de RNA
Polinucleótido quinasa	Añade un grupo fosfato al grupo OH del extremo 5′de un polinucleótido para marcarlo o para permitir su ligación
Transferasa terminal	Añade colas homopoliméricas al grupo OH del extremo 3′ de un dúplex lineal
Exonucleasa III	Elimina nucleótidos de los extremos 3′ de una hebra de DNA.
Exonucleasa del bacteriófago λ	Elimina nucleótidos de los extremos 5′ de un dúplex para exponer los extremos 3′ monohebra
Fosfatasa alcalina	Elimina fosfatos terminales tanto del extremo 5′ como del 3′ (o de ambos)

pia endonucleasa de restricción está protegida de la digestión por metilación del DNA, catalizada por una metilasa de DNA específica. El conjunto formado por la endonucleasa de restricción y la metilasa correspondiente se conoce a veces como **sistema de modificación-restricción.**

Hay tres tipos de endonucleasas de restricción, designados como I, II, y III. Los tipos I y III son grandes complejos formados por múltiples subunidades que contienen, simultáneamente, las actividades endonucleasa y metilasa. Las endonucleasas de restricción de tipo I cortan el DNA al azar, en lugares que pueden encontrarse a 1.000 pares de bases (pb) o más de la secuencia de reconocimiento. Las endonucleasas de restricción de tipo III cortan el DNA a unos 25 pares de bases de la secuencia de reconocimiento. Ambos tipos de enzimas se mueven a lo largo del DNA mediante un mecanismo que necesita la energía del ATP. Las **endonucleasas de restricción de tipo II,** aisladas por primera vez por Hamilton Smith en 1970, son más sencillas, no necesitan ATP y cortan el DNA en la misma secuencia de reconocimiento. La extraordinaria utilidad de estos enzimas fue demostrada por Daniel Nathans, quien los usó por primera vez para desarrollar nuevos métodos para cartografiar y analizar genes y genomas.

Se han descubierto millares de endonucleasas de restricción en diferentes especies bacterianas y más de 100 secuencias de DNA diferentes son reconocidas por uno o más de estos enzimas. Las secuencias reconocidas tienen normalmente de 4 a 6 pares de bases y son palindrómicas (véase la Fig. 8–18). En la Tabla 9–2 se muestran unas pocas secuencias reconocidas por algunas endonucleasas de restricción de tipo II.

TABLA 9–2 Secuencias de reconocimiento para algunas endonucleasas de restricción de tipo II

Enzima	Secuencia
*Bam*HI	(5′) G↓G A T C* C (3′) C C* T A G↑G
*Cla*I	(5′) A T↓C G A* T (3′) T A* G C↑T A
*Eco*RI	(5′) G↓A A* T T C (3′) C T T A* A↑G
*Eco*RV	(5′) G A T↓A T C (3′) C T A↑T A G
*Hae*III	(5′) G G↓C* C (3′) C C*↑G G
*Hin*dIII	(5′) A↓A G C T T (3′) T T C G A↑A
*Not*I	(5′) G C↓G G C C G C (3′) C G C C G G↑C G
*Pst*I	(5′) C T G C* A↓G (3′) G↑A C* G T C
*Pvu*II	(5′) C A G↓C T G (3′) G T C↑G A C
*Tth*111I	(5′) G A C N↓N N G T C (3′) C T G N↑N N C A G

Las flechas indican los enlaces fosfodiéster hidrolizados por cada endonucleasa de restricción. Los asteriscos indican las bases que son metiladas por la correspondiente metilasa (si se conoce). N representa cualquier base. El nombre de los enzimas consiste en una abreviatura de tres letras (en cursiva) del nombre de la especie bacteriana de la cual proviene, seguida a veces por una indicación de la cepa y números romanos para distinguir diferentes endonucleasas de restricción aisladas de la misma especie bacteriana. Por lo tanto, *Bam*HI es la primera (I) endonucleasa de restricción caracterizada procedente de *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa H.

Algunas endonucleasas de restricción realizan cortes indentados en las dos hebras del DNA, que dejan de dos a cuatro nucleótidos desapareados en cada extremo resultante. Se denominan **extremos cohesivos (Fig. 9–2a)**, ya que pueden aparearse entre sí o con extremos cohesivos complementarios de otros fragmentos de DNA. Otras endonucleasas de restricción cortan ambas cadenas del DNA en los enlaces fosfodiéster opuestos, y no dejan bases desapareadas en ningún extremo; estos extremos se denominan **extremos romos** (Fig. 9–2b).

El tamaño medio de los fragmentos producidos al cortar DNA genómico con una determinada endonucleasa de restricción depende de la frecuencia con que se encuentre su lugar de restricción en la molécula de DNA, que, a su vez, depende en buena medida del tamaño de la secuencia de reconocimiento. En una molécula de DNA de secuencia al azar, en la que todos los nucleótidos fuesen igualmente abundantes, una secuencia de 6 pares de bases reconocida por una endonucleasa de restricción tal como *Bam*HI se encontraría como promedio una vez cada 4^6 (4.096) pares de bases, suponiendo un contenido en G≡C del 50%. Los enzimas que reconocen una secuencia de 4 pares de bases producirían fragmentos de DNA más pequeños en una molécula de DNA de secuencia al azar; una secuencia de este tamaño debería encontrarse, como promedio, una vez cada 4^4 (256) pares de bases. En las moléculas de DNA naturales las secuencias de reconocimiento suelen ocurrir con menor frecuencia de lo esperado según estos cálculos, porque las secuencias de nucleótidos en el DNA no son al azar y los cuatro nucleótidos no son igualmente abundantes. En experimentos de laboratorio, el tamaño medio de los fragmentos producidos por rotura de grandes moléculas de DNA por endo-

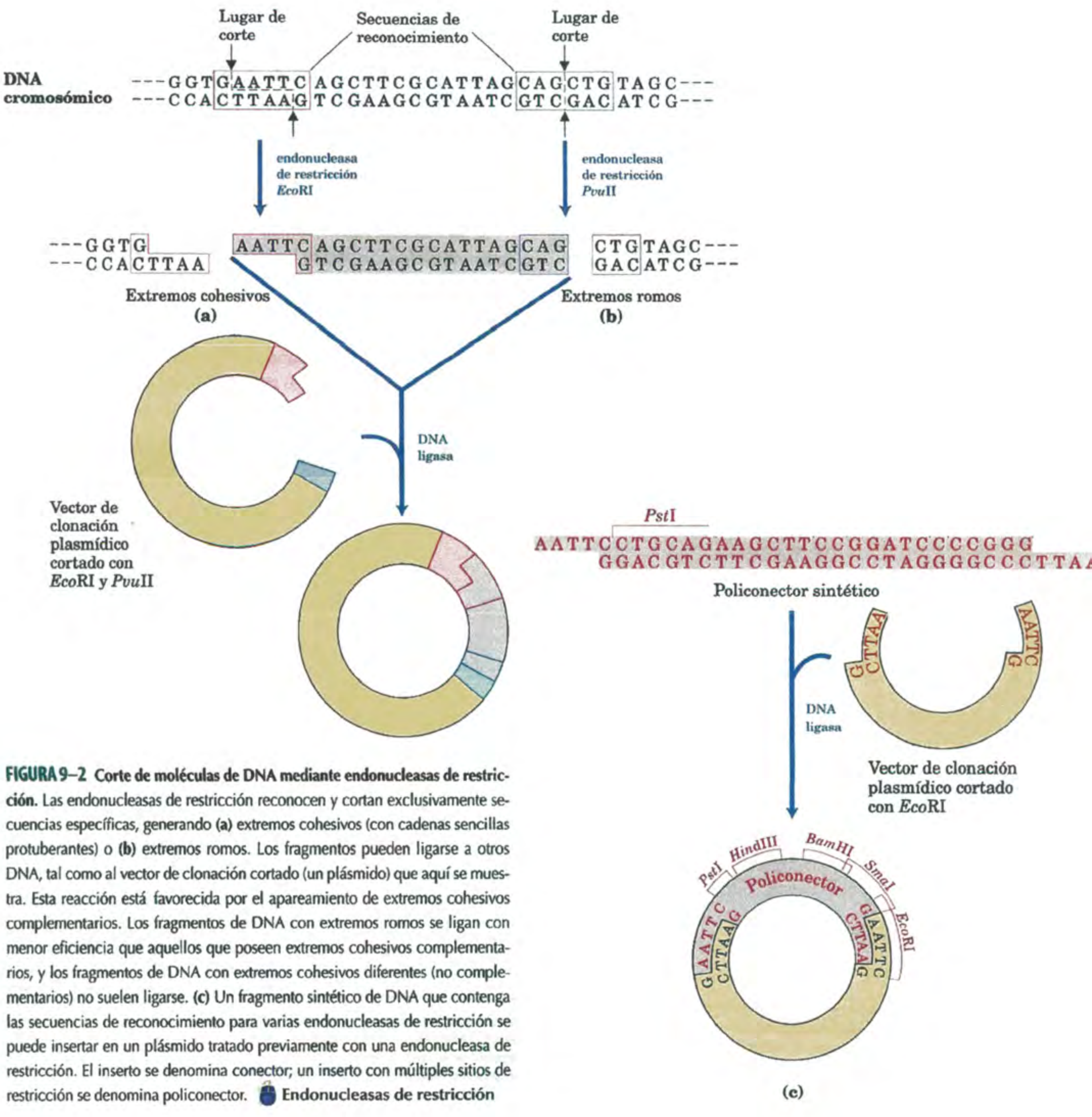


FIGURA 9–2 Corte de moléculas de DNA mediante endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción reconocen y cortan exclusivamente secuencias específicas, generando **(a)** extremos cohesivos (con cadenas sencillas protuberantes) o **(b)** extremos romos. Los fragmentos pueden ligarse a otros DNA, tal como al vector de clonación cortado (un plásmido) que aquí se muestra. Esta reacción está favorecida por el apareamiento de extremos cohesivos complementarios. Los fragmentos de DNA con extremos romos se ligan con menor eficiencia que aquellos que poseen extremos cohesivos complementarios, y los fragmentos de DNA con extremos cohesivos diferentes (no complementarios) no suelen ligarse. **(c)** Un fragmento sintético de DNA que contenga las secuencias de reconocimiento para varias endonucleasas de restricción se puede insertar en un plásmido tratado previamente con una endonucleasa de restricción. El inserto se denomina conector; un inserto con múltiples sitios de restricción se denomina policonector. **Endonucleasas de restricción**

nucleasas de restricción puede aumentarse, simplemente terminando la reacción antes de que se haya completado. Este procedimiento se denomina digestión parcial. El tamaño de los fragmentos también puede aumentarse con las endonucleasas mensajeras (véase la Fig. 26–38), que reconocen y cortan secuencias de DNA mucho más largas (14 a 20 pares de bases).

Una vez que se ha roto una molécula de DNA en varios fragmentos, un fragmento de un tamaño conocido puede aumentar su concentración mediante electroforesis en agarosa o en gel de acrilamida o mediante HPLC (pp. 89, 88). Pero para un genoma típico de mamífero, la rotura mediante una endonucleasa de restricción produce demasiados fragmentos diferentes de DNA para que sea posible el aislamiento de un fragmento determinado. Un paso intermedio común en la clonación de un gen específico o segmento de DNA es la construcción de una genoteca de DNA (descrita en la Sección 9.2).

Una vez aislado el fragmento de DNA deseado, la DNA ligasa permite unirlo a un vector de clonación digerido de forma similar, es decir, un vector digerido con la *misma* endonucleasa de restricción; un fragmento generado por *Eco*RI, por ejemplo, no se unirá a un fragmento generado con *Bam*HI. Tal como se describe en el Capítulo 25 (véase la Fig. 25–17), la DNA ligasa cataliza la formación de nuevos enlaces fosfodiéster en una reacción que usa ATP u otro cofactor similar. El apareamiento de los extremos cohesivos complementarios facilita la reacción de ligación (Fig. 9–2a). Los extremos romos también se pueden ligar, aunque con menor eficiencia. Se pueden crear nuevas secuencias de DNA insertando fragmentos de DNA sintéticos (denominados **conectores**) entre los extremos que tienen que ligarse. Los fragmentos de DNA insertados que contienen secuencias múltiples de reconocimiento para endonucleasas de restricción (útiles como puntos de inserción de otros DNA por corte y ligación) se denominan **policonectores** (Fig. 9–2c).

La eficacia de los extremos cohesivos para la unión de dos fragmentos de DNA se evidenció en los primeros experimentos con DNA recombinante. Antes que las endonucleasas de restricción fuesen disponibles, algunos investigadores vieron que era posible generar extremos cohesivos por la acción combinada de la exonucleasa del bacteriófago λ y la transferasa terminal (Tabla 9–1). Así, los fragmentos de DNA que debían unirse adquirían colas homopoliméricas complementarias. Este método fue utilizado por Peter Lobban y Dale Kaiser en 1971 en los primeros experimentos de unión de fragmentos de DNA naturales. Poco después, en el laboratorio de Paul Berg se utilizaron métodos similares para unir segmentos de DNA del virus 40 de simio (SV40) con DNA derivado del bacteriófago λ, generándose la primera molécula de DNA recombinante que contenía fragmentos de DNA de especies diferentes.

Los vectores de clonación permiten la amplificación de fragmentos de DNA insertados

Los principios que gobiernan las formas de presentación del DNA recombinante a las células huésped para su clonación y amplificación pueden ilustrarse convenientemente considerando los tres vectores de clonación más comúnmente usados en los experimentos con *E. coli* –plásmidos, bacteriófagos y cromosomas bacterianos artificiales– y uno de los vectores usados para clonar grandes fragmentos de DNA en levadura.

Plásmidos Los plásmidos son moléculas de DNA circulares que se replican con independencia del cromosoma del huésped. Los plásmidos bacterianos naturales tienen tamaños entre 5.000 y 400.000 pares de bases. Pueden introducirse en las células bacterianas mediante un proceso denominado **transformación.** Las células (generalmente *E. coli*) junto con el DNA plasmídico se incuban a 0 °C en una disolución de cloruro cálcico y a continuación son sometidas a un choque térmico, elevando rápidamente la temperatura hasta 37-43 °C. Por razones no bien comprendidas, algunas de las células tratadas de este modo incorporan el DNA plasmídico. Algunas especies bacterianas tales como *Acinetobacter baylyi* son competentes por naturaleza para la incorporación de DNA y no requieren el tratamiento con cloruro cálcico. Un método alternativo consiste en aplicar un pulso de alto voltaje a las células incubadas con el plásmido. Este tratamiento, denominado **electroporación,** permeabiliza transitoriamente la membrana a las grandes moléculas.

Con independencia del método utilizado, sólo unas pocas células captan el DNA plasmídico; se necesita, pues, un método para seleccionar las que lo hayan hecho. La estrategia más común consiste en incluir en el plásmido un gen que permita que la célula huésped crezca en determinadas condiciones, tal como un gen de resistencia a un antibiótico. Sólo aquellas células que hayan sido transformadas por el plásmido recombinante podrán crecer en presencia del antibiótico. Cualquier célula que contenga el plásmido será "seleccionable" en estas condiciones de cultivo. Esos genes se denominan marcadores seleccionables.

Se han desarrollado muchos vectores plasmídicos para la clonación mediante la modificación de plásmidos naturales. El ya clásico plásmido de *E. coli* pBR322 es un buen ejemplo de las características útiles de un vector de clonación (**Fig. 9–3**).

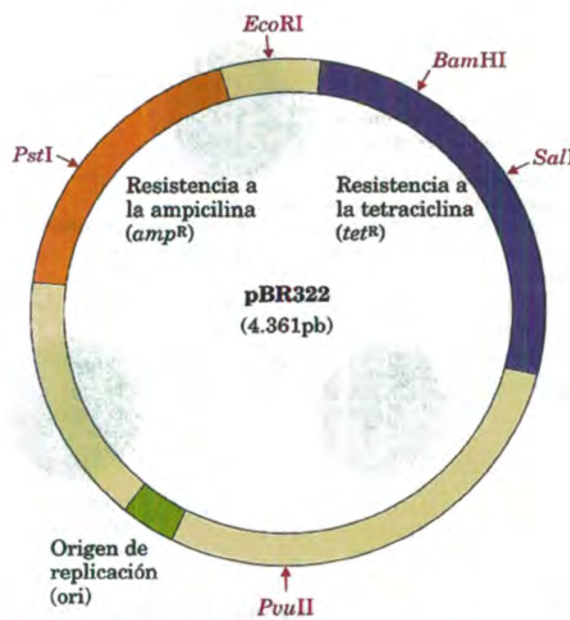


FIGURA 9–3 Diseño del plásmido pBR322. Observe la localización de algunos sitios de restricción importantes para *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I y *Pvu*II; de los genes de resistencia a ampicilina y a tetraciclina y del origen de replicación (ori). Construido en 1977, fue uno de los primeros plásmidos diseñados específicamente para la clonación en *E. coli*.

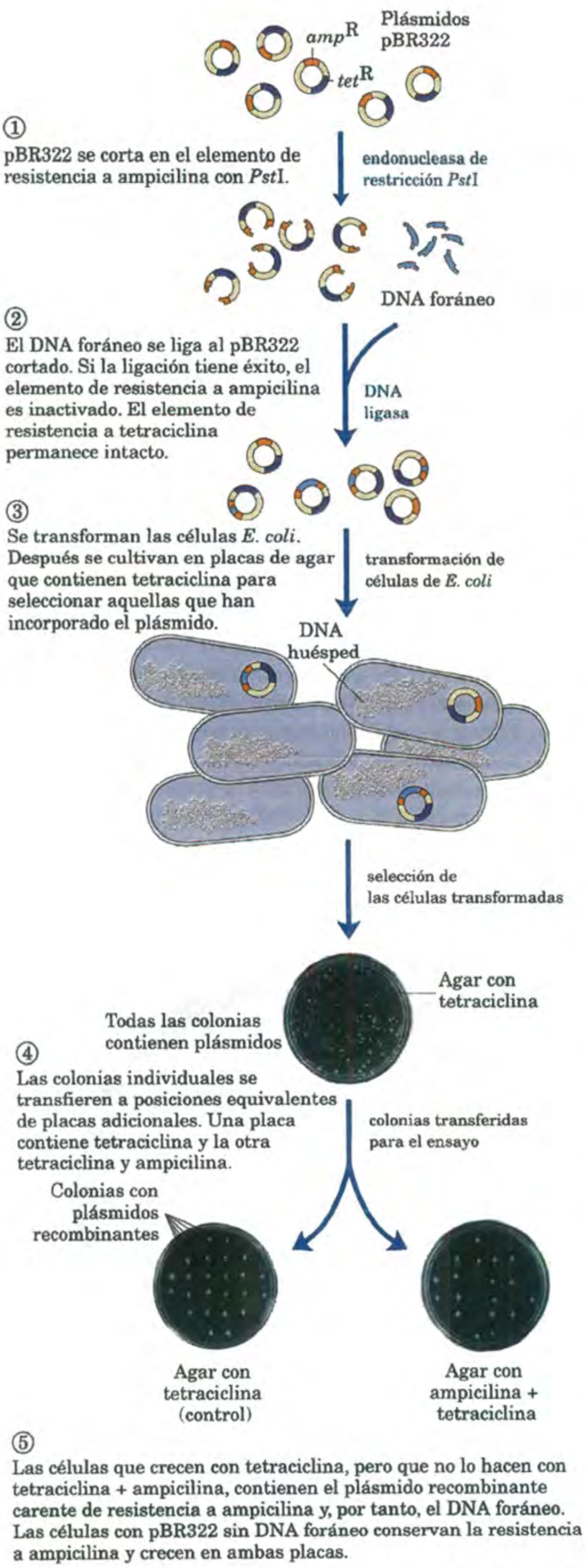


FIGURA 9–4 Clonación e identificación de DNA foráneo en *E. coli* con pBR322. Clonación de plásmidos

Entre las características importantes del plásmido pBR322 destacan:

1. Un origen de replicación, ori, en el cual los enzimas celulares inician la replicación (Capítulo 25). Esta secuencia es necesaria para propagar el plásmido y mantenerlo en un nivel de 10 a 20 copias por célula.
2. Dos genes que confieren resistencia a diferentes antibióticos (tet^R, amp^R), que permiten la selección de las células que contengan el plásmido intacto o una versión recombinante del mismo **(Fig. 9–4)**.
3. Varias secuencias únicas de reconocimiento para diferentes endonucleasas de restricción (*Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I, *Pvu*II), que suministran los sitios por los cuales cortar el plásmido para insertar las secuencias de DNA foráneo.
4. El pequeño tamaño (4.361 pb), que facilita la entrada en la célula y la manipulación bioquímica del DNA.

La transformación de células bacterianas típicas con DNA purificado (proceso nunca muy eficiente) decrece al aumentar el tamaño del plásmido, siendo difícil la clonación de segmentos de DNA mayores de unos 15.000 pares de bases cuando se utiliza un plásmido como vector.

Bacteriófagos El bacteriófago λ tiene un mecanismo muy eficiente para introducir sus 48.502 pares de bases de DNA en la bacteria, y puede ser usado como vector para clonar fragmentos de DNA algo mayores **(Fig. 9–5)**. Su utilidad se basa en dos características principales:

1. Alrededor de un tercio del genoma de λ no es esencial y puede ser reemplazado por DNA foráneo.
2. El DNA se empaqueta en partículas de fago infecciosas sólo si su tamaño se encuentra entre 40.000 y 53.000 pares de bases, limitación aprovechable para lograr que solamente se empaquete el DNA recombinante.

Se han desarrollado vectores derivados del bacteriófago λ que se pueden cortar fácilmente en tres trozos, dos de los cuales contienen genes esenciales, que totalizan sólo unos 30.000 pares de bases. El tercer trozo, o DNA "de relleno", es descartado cuando el vector se usa para la clonación. Por tanto, debe introducirse DNA adicional entre los dos segmentos esenciales para generar moléculas ligadas de DNA suficientemente largas para producir partículas de fago viables. En efecto, el mecanismo de empaquetamiento *selecciona* eficazmente los DNA víricos recombinantes.

Los vectores del bacteriófago λ permiten la clonación de fragmentos de DNA de hasta 23.000 pares de bases. Una vez los fragmentos del bacteriófago λ han sido ligados con fragmentos de DNA foráneo de tamaño adecuado, los DNA recombinantes resultantes se pueden empaquetar en partículas de fago añadiendo un extracto crudo de células bacterianas que contenga todas aquellas proteínas que son necesarias para ensamblar un fago completo. Esta operación recibe el nombre de **empaquetamiento in vitro** (Fig. 9–5). Todas las partículas de fago viables contendrán un fragmento de DNA foráneo. La transmisión ulterior del DNA recombinante a células de *E. coli* es muy eficiente.

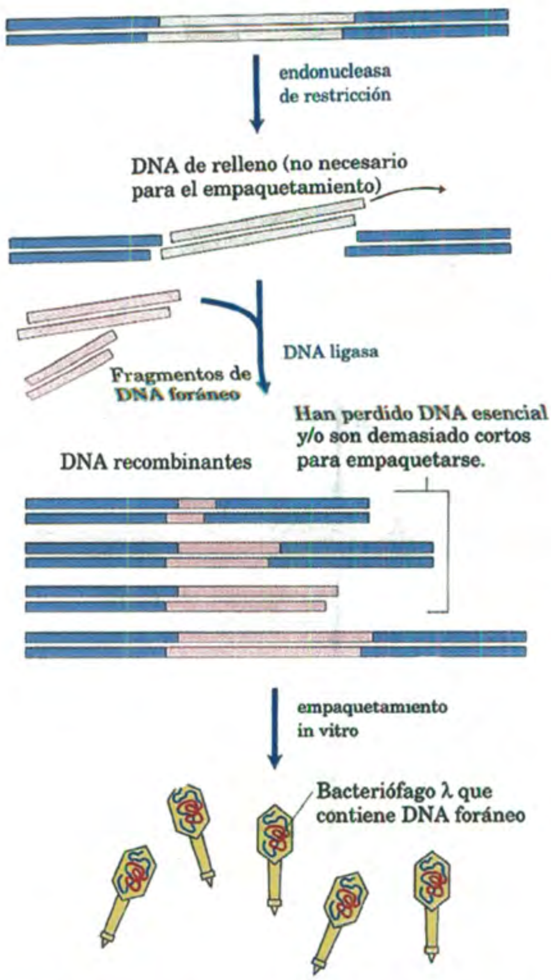
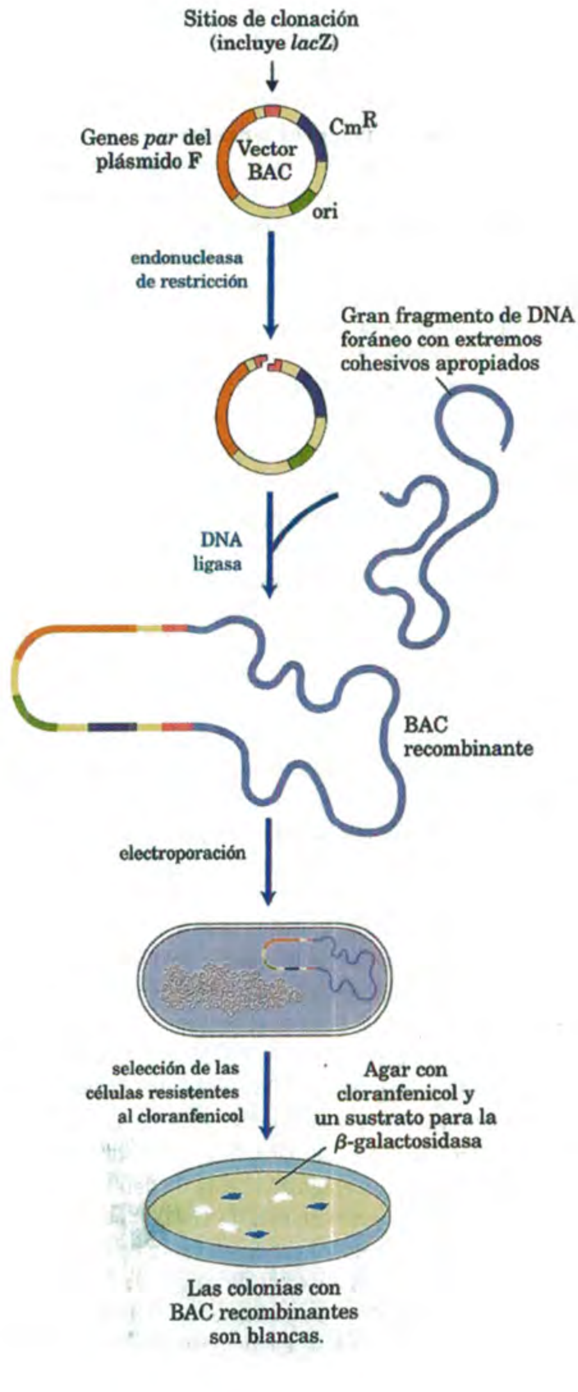


FIGURA 9–5 Vectores de clonación de bacteriófagos. Se han utilizado los métodos del DNA recombinante para eliminar del genoma del bacteriófago λ los genes no esenciales para la producción del fago, reemplazándolos con DNA de "relleno" para que el DNA del vector sea suficientemente grande para empaquetarse en las partículas de fago. Tal como se muestra aquí el DNA de relleno se puede reemplazar por DNA foráneo en los experimentos de clonación. Los recombinantes se empaquetan en partículas de fago viables in vitro solamente si contienen un fragmento de DNA foráneo de tamaño conveniente, además de los dos fragmentos esenciales de los extremos del DNA de λ.

FIGURA 9–6 Clonación con cromosomas bacterianos artificiales (BAC) como vectores. El vector es un plásmido relativamente simple, con un origen de replicación (ori) que dirige la replicación. Los genes *par*, derivados de un tipo de plásmido, denominado plásmido F, facilitan la distribución uniforme de los plásmidos entre las células hijas en la división celular. Ello aumenta la posibilidad de que cada célula hija contenga una copia del plásmido, incluso cuando hay pocas copias. Conviene que el número de copias sea bajo cuando se clonan segmentos grandes de DNA porque así disminuyen las posibilidades de que se produzcan reacciones de recombinación no deseadas, que pueden alterar con el tiempo los fragmentos de gran tamaño de DNA clonado. En los BAC se incluyen marcadores seleccionables. Un gen *lacZ* (necesario para la producción del enzima β-galactosidasa) está situado en la región de clonación de manera que sea inactivado por los insertos de DNA clonados. La introducción de BAC recombinantes en las células por electroporación es más fácil con células con la pared celular alterada (más porosa). El escrutinio de los DNA recombinantes se efectúa por resistencia a cloranfenicol (Cm^R). Las placas también contienen un sustrato artificial de la β-galactosidasa que da un producto coloreado. Las colonias con β-galactosidasa activa y, por lo tanto, sin inserto en el vector BAC, se vuelven azules; las colonias sin actividad β-galactosidasa y, por tanto, con los insertos de DNA deseados, son blancas.

Cromosomas bacterianos artificiales (BAC) Los cromosomas bacterianos artificiales son simplemente plásmidos diseñados para la clonación de fragmentos de DNA muy largos (habitualmente entre 100.000 y 300.000 pares de bases) **(Fig. 9–6)**. Generalmente incluyen marcadores seleccionables, tales como la resistencia al cloranfenicol (Cm^R), así como un origen de replicación muy estable (ori), que mantiene una o dos copias del plásmido por célula. Los fragmentos de DNA de varios centenares de miles de pares de bases se clonan en vectores BAC. Estas grandes moléculas de DNA circular son introducidas en las bacterias huésped por electroporación. Las bacterias huésped usadas con los BAC recombinantes tienen mutaciones que afectan la estructura de la pared bacteriana que facilitan la incorporación de estas grandes moléculas de DNA.



Cromosomas artificiales de levaduras (YAC) Las células de *E. coli* no son en absoluto los únicos huéspedes utilizados en ingeniería genética. Las levaduras son organismos eucarióticos especialmente convenientes para este trabajo. Como en *E. coli*, la genética de las levaduras es bien conocida. El genoma de la levadura más comúnmente utilizada, *Saccharomyces cerevisiae*, contiene sólo 14×10^6 pares de bases (un genoma simple para los estándares eucarióticos, con menos de cuatro veces el tamaño del cromosoma de *E. coli*), y su secuencia se conoce en su totalidad. Las levaduras son también muy fáciles de mantener y de cultivar a gran escala en el laboratorio. Se han construido vectores plasmídicos para levadura, usando los mismos principios que se aplican a los vectores de *E. coli* descritos anteriormente. Actualmente se dispone de métodos eficaces para introducir y extraer DNA de células de levadura, que facilitan el estudio de muchos aspectos de la bioquímica de las células eucarióticas. Algunos plásmidos recombinantes contienen múltiples orígenes de replicación y otros elementos que hacen posible su uso en más de una especie (por ejemplo, levadura o *E. coli*). Los plásmidos que pueden propagarse en células de dos o más especies diferentes se denominan **vectores lanzadera.**

El trabajo con grandes genomas que exigen vectores de clonación de gran capacidad llevó al desarrollo de los **cromosomas artificiales de levadura (YAC; Fig. 9–7)**. Los vectores YAC contienen todos los elementos necesarios para mantener un cromosoma eucariótico en el núcleo de la levadura: un origen de replicación de levadura, dos marcadores seleccionables y secuencias especializadas (derivadas de los telómeros y el centrómero, regiones del cromosoma descritas en el Capítulo 24), necesarias para la estabilidad y la segregación correcta de los cromosomas en la división celular. Antes de su uso en la clonación, el vector es propagado en forma de plásmido circular bacteriano. El corte con una endonucleasa de restricción (*Bam*HI en la Fig. 9–7) elimina un trozo de DNA entre dos secuencias teloméricas (TEL), dejando los telómeros en los extremos del DNA linearizado. El corte en otro sitio interno (*Eco*RI en la Fig. 9–7) divide el vector en dos fragmentos de DNA, denominados brazos del vector, cada uno con un marcador seleccionable distinto.

El DNA genómico se prepara por digestión parcial con endonucleasas de restricción (*Eco*RI en la Fig. 9–7) para obtener un fragmento de tamaño adecuado. Los fragmentos genómicos se separan por **electroforesis de campo pulsante,** una variante de la electroforesis en gel (véase la Fig. 3–18) que permite la separación de trozos de DNA muy grandes. Los fragmentos de DNA de tamaño apropiado (hasta unos 2×10^6 pares de bases) se mezclan y se ligan con los brazos del vector. La mezcla de ligación se usa a continuación para transformar células de levadura con moléculas de DNA muy grandes. El cultivo en un medio que requiera la presencia de los dos marcadores genéticos seleccionables asegura que sólo crezcan las células de levadura que contengan un cromosoma artificial con un gran inserto entre los dos brazos del vector (Fig. 9–7). La estabilidad de los clones YAC aumenta con el tamaño hasta un determinado límite. Los que poseen insertos de más de 150.000 pares de bases son casi tan estables como los cromosomas celulares normales, mientras que aquellos con insertos de menos de 100.000 pares de bases van perdiéndose paulatinamente durante la mitosis (por ello generalmente no se encuentran clones de levadura con sólo los extremos del vector ligados o con insertos cortos). Los YAC que carecen de un telómero en cualquiera de los extremos son rápidamente degradados.

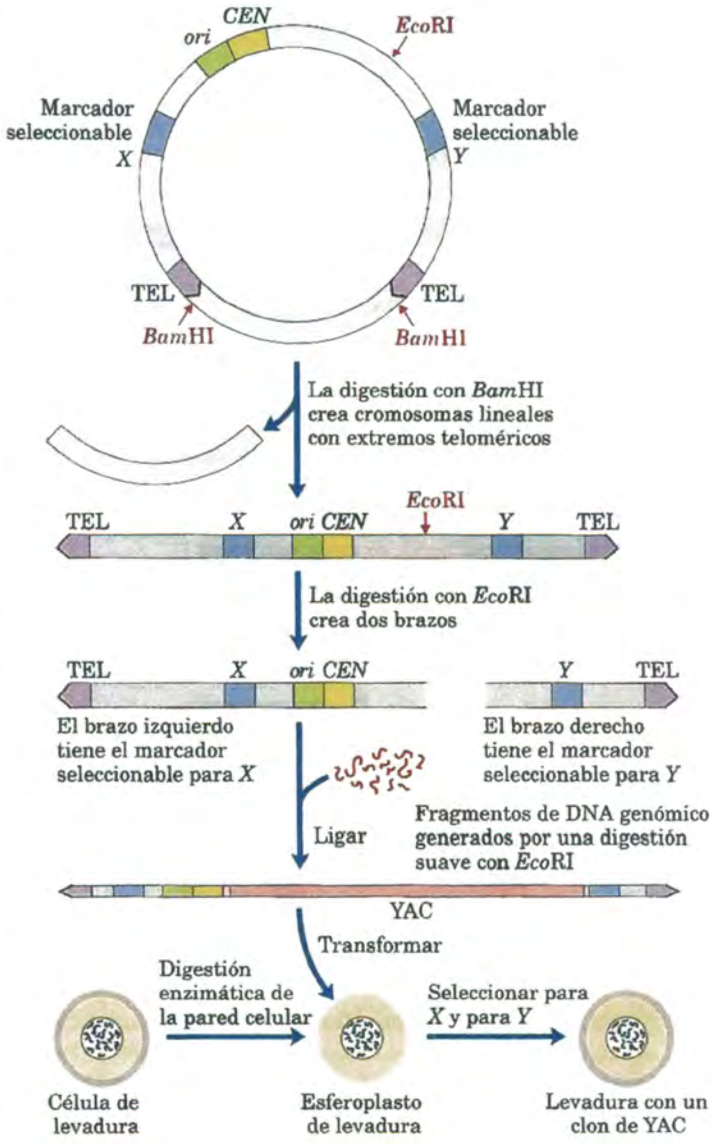


FIGURA 9–7 Construcción de un cromosoma de levadura artificial (YAC). Un vector YAC contiene un origen de replicación (*ori*), un centrómero (*CEN*), dos telómeros (TEL) y marcadores seleccionables (*X* e *Y*). La digestión con *Bam*HI y *Eco*RI genera dos brazos de DNA separados, cada uno con un extremo telomérico y un marcador seleccionable. Es posible ligar un gran segmento de DNA (por ejemplo, de 2×10^6 pares de bases de un cromosoma humano) con los dos brazos para crear un cromosoma artificial de levadura. El YAC puede transformar células de levadura (preparadas por eliminación de la pared celular para formar esferoplastos), que serán seleccionadas con respecto a *X* e *Y*; las células de levadura supervivientes propagarán el inserto.

La hibridación permite la detección de secuencias de DNA específicas

La hibridación del DNA, cuyas principales características se han descrito en el Capítulo 8 (véase la Fig. 8–29), es la más común de las técnicas basadas en la secuencia para detectar un gen particular o un segmento de ácido nucleico. Hay muchas versiones del método básico y la mayoría usan un fragmento de DNA

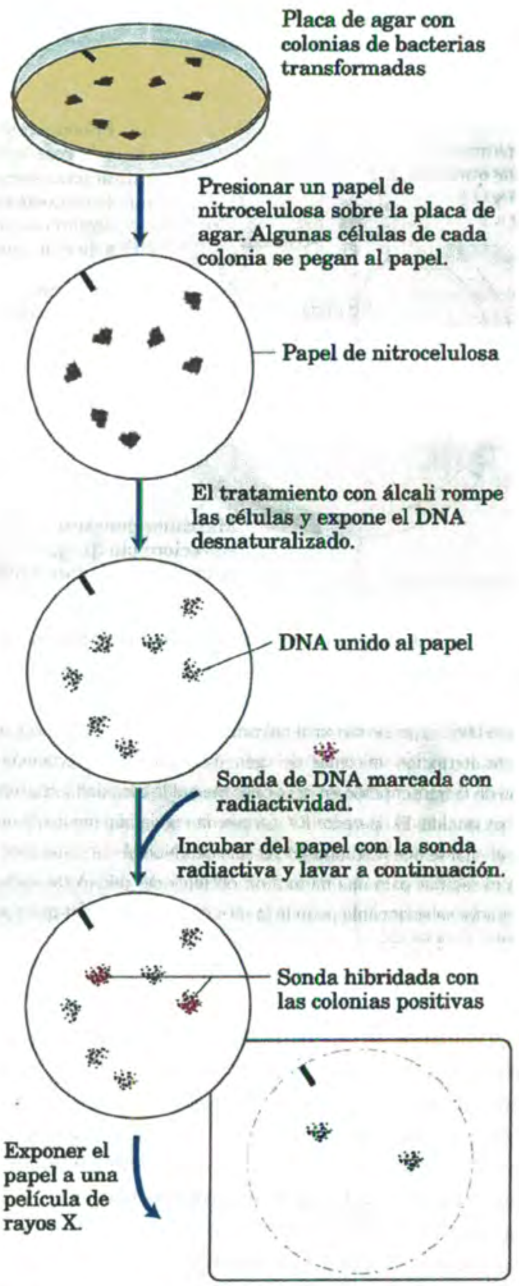
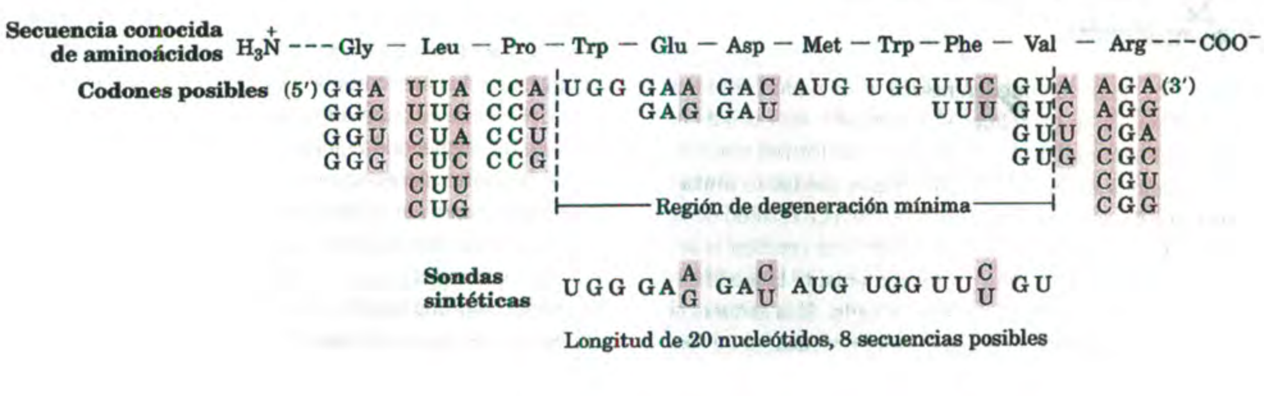


FIGURA 9–8 Identificación de un clon con un determinado fragmento de DNA por hibridación. La sonda de DNA radiactivo hibrida con el DNA complementario y se revela por autorradiografía. Una vez identificadas las colonias marcadas, se pueden usar las correspondientes colonias de la placa de agar original como fuente de DNA clonado para estudios posteriores.

o de RNA marcado (por ejemplo, con radiactividad), denominado **sonda,** complementario del DNA buscado. En un método clásico para detectar una secuencia de DNA concreta en una genoteca (una colección de clones de DNA), se presiona un papel de nitrocelulosa contra una placa de agar con muchas colonias bacterianas individuales, cada una de las cuales contiene un fragmento de DNA recombinante distinto. Algunas células de cada colonia se adhieren al papel, formando una réplica de la placa. El papel se trata con álcali para romper las células y desnaturalizar el DNA que contienen, el cual permanece unido al papel en la región de la colonia de procedencia. A continuación, se añade al papel la sonda de DNA marcada radiactivamente, que hibridará solamente con el DNA complementario. Después de lavar la sonda sobrante, el DNA híbrido puede detectarse por autorradiografía **(Fig. 9–8)**.

Frecuentemente, el paso limitante en la detección o en la clonación de un gen consiste en obtener una cadena complementaria de ácido nucleico para usarla como sonda. El origen de la sonda depende del conocimiento disponible sobre el gen investigado. A veces, puede usarse un gen homólogo, clonado a partir de otra especie. Si se ha purificado la proteína producto de un gen, se pueden diseñar y sintetizar sondas cuya secuencia corresponda a la de los aminoácidos **(Fig. 9–9)**. Hoy en día es frecuente obtener la información sobre las secuencias de DNA en los bancos de datos, que almacenan información sobre la estructura de miles de genes de una gran variedad de organismos.

FIGURA 9–9 Diseño de una sonda para detectar el gen de una proteína de secuencia de aminoácidos conocida. Debido a que el código genético está "degenerado", hay varias secuencias de DNA que pueden codificar una secuencia de aminoácidos determinada. (Tal como se describe en el Capítulo 27, un aminoácido está codificado por un conjunto de tres nucleótidos denominado codón. La mayoría de aminoácidos tienen dos o más codones; véase la Fig. 27–7.) Como no se puede conocer la secuencia de DNA correcta de antemano, se diseña la sonda para que sea complementaria de la zona de mínima degeneración del gen, es decir, una región con el menor número posible de codones para los aminoácidos —dos codones como máximo en el ejemplo aquí mostrado—. Se sintetizan oligonucleótidos con secuencias selectivamente promediadas, de tal manera que contengan uno de los dos posibles nucleótidos en cada posición de potencial degeneración (sombreados en rosa). En el ejemplo mostrado, el oligonucleótido sintetizado consiste en una mezcla de ocho secuencias diferentes: una de las ocho será totalmente complementaria del gen, y todas ellas tendrán al menos 17 de las 20 posiciones complementarias.



La expresión de genes clonados produce grandes cantidades de proteína

Frecuentemente, más que en el gen en sí mismo, el interés reside en su producto, sobre todo si la proteína tiene valor comercial, terapéutico o para la investigación. La comprensión de los fundamentos básicos del metabolismo del DNA, el RNA y las proteínas y su regulación en *E. coli*, ha hecho posible la expresión de genes clonados para estudiar sus productos proteicos.

La mayoría de genes eucarióticos carecen de las secuencias de DNA —tales como los promotores, secuencias para la unión de la RNA polimerasa— necesarias para su expresión en *E. coli*; es, pues, necesario insertar las secuencias reguladoras bacterianas para la transcripción y la traducción en el DNA del vector en posiciones apropiadas en relación al gen eucariótico. (Los promotores, las secuencias reguladoras y otros aspectos de la regulación de la expresión génica se tratan en el Capítulo 28.) En algunos casos, los genes clonados se expresan tan eficazmente que el producto proteico puede representar más del 10% de la proteína celular; se habla entonces de sobreexpresión. Algunas proteínas foráneas pueden matar las células de *E. coli* a tan altas concentraciones; en estos casos se ha de limitar la expresión génica a unas pocas horas antes de recoger las células.

Los vectores de clonación que contienen las señales de transcripción y traducción necesarias para regular la expresión de un gen clonado se denominan frecuentemente **vectores de expresión**. La velocidad de expresión del gen clonado es controlada reemplazando las secuencias reguladoras del propio promotor del gen por versiones más eficientes y convenientes suministradas por el vector. En general, para la clonación se coloca un promotor bien caracterizado con sus elementos reguladores cerca de varios sitios de restricción únicos, de manera que los genes insertados en los sitios de restricción se expresen bajo el control del promotor **(Fig. 9–10)**. Algunos de estos vectores incorporan otras características, tales como lugares de unión al ribosoma para mejorar la traducción del mRNA derivado del gen o una secuencia de terminación de la transcripción.

Análogamente, los genes se pueden clonar y expresar en células eucarióticas, habitualmente en levadura. En los huéspedes eucarióticos a veces se incorporan modificaciones postraducción (cambios en la estructura proteica posteriores a la síntesis en los ribosomas) que pueden ser necesarias para la funcionalidad de la proteína eucariótica clonada.

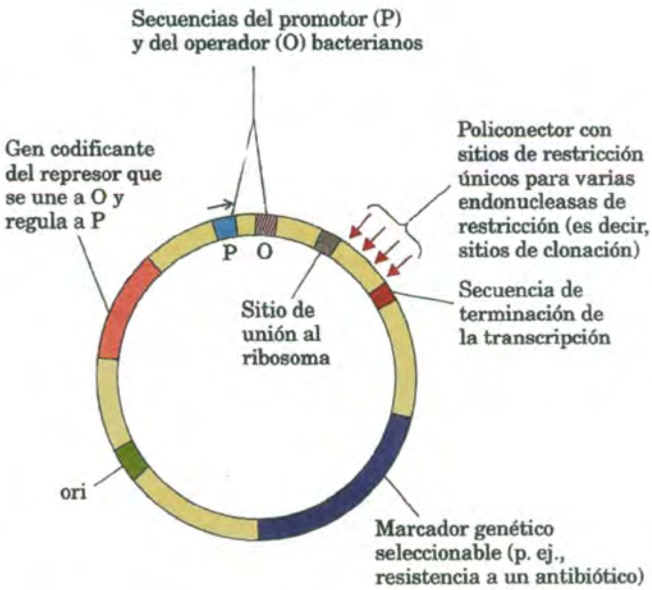


FIGURA 9–10 Tipos de secuencias de DNA presentes habitualmente en un vector de expresión en *E. coli*. Se inserta el gen que se desea expresar en uno de los sitios de restricción del policonector, cerca del promotor (P), con el extremo que codifica el amino terminal próximo al promotor. El promotor posibilita una transcripción eficiente del gen insertado, y la secuencia de terminación de la transcripción en ocasiones mejora la cantidad y estabilidad del mRNA producido. El operador (O) permite la regulación mediante un represor con el cual se une (Capítulo 28). El sitio de unión al ribosoma contiene las señales necesarias para una traducción eficiente del mRNA derivado del gen. El marcador seleccionable permite la selección de las células que contienen el DNA recombinante.

La alteración de los genes clonados produce proteínas modificadas

Las técnicas de clonación pueden usarse no sólo para obtener grandes cantidades de proteínas, sino también para producir proteínas sutilmente alteradas respecto a sus formas nativas. Se pueden cambiar aminoácidos individuales mediante **mutagénesis dirigida.** Esta poderosa metodología de estudio de la estructura y función de las proteínas consiste en cambiar la secuencia de aminoácidos de una proteína mediante la modificación de la secuencia del DNA del gen clonado. Si la secuencia que se pretende modificar está flanqueada por lugares de restricción apropiados, se puede realizar el cambio simplemente por sustitución del fragmento original de DNA por un fragmento sintético que contenga los cambios deseados **(Fig. 9–11a)**. Si no hay lugares de restricción localizados adecuadamente, se puede usar una aproximación denominada **mutagénesis dirigida por oligonucleótido** (Fig. 9–11b) para generar un cambio específico en la secuencia del DNA. Un fragmento corto de DNA sintético, con un cambio de base específico, se hibrida con un copia de cadena sencilla del gen clonado, insertada en un vector adecuado. Una base desapareada entre 15 o 20 pb no impide la hibridación, si se realiza a una temperatura adecuada. Este fragmento, una vez apareado, sirve de cebador para la síntesis de la hebra complementaria del vector. El plásmido recombinante de doble cadena con el leve desapareamiento se usa para transformar bacterias, en las cuales el desapareamiento será reparado por los enzimas celulares de reparación del DNA (Capítulo 25). Aproximadamente la mitad de las operaciones de reparación eliminarán y reemplazarán la base alterada, restableciendo la secuencia original del gen; la otra mitad eliminará y reemplazará la base *normal*, manteniendo la mutación deseada. Los transformantes se analizan (generalmente, por secuenciación del DNA plasmídico) hasta encontrar una colonia que contenga un plásmido con la secuencia modificada.

Se pueden introducir cambios en más de un par de bases. Se pueden suprimir partes importantes de un gen, cortando un segmento con endonucleasas de restricción y ligando las por-

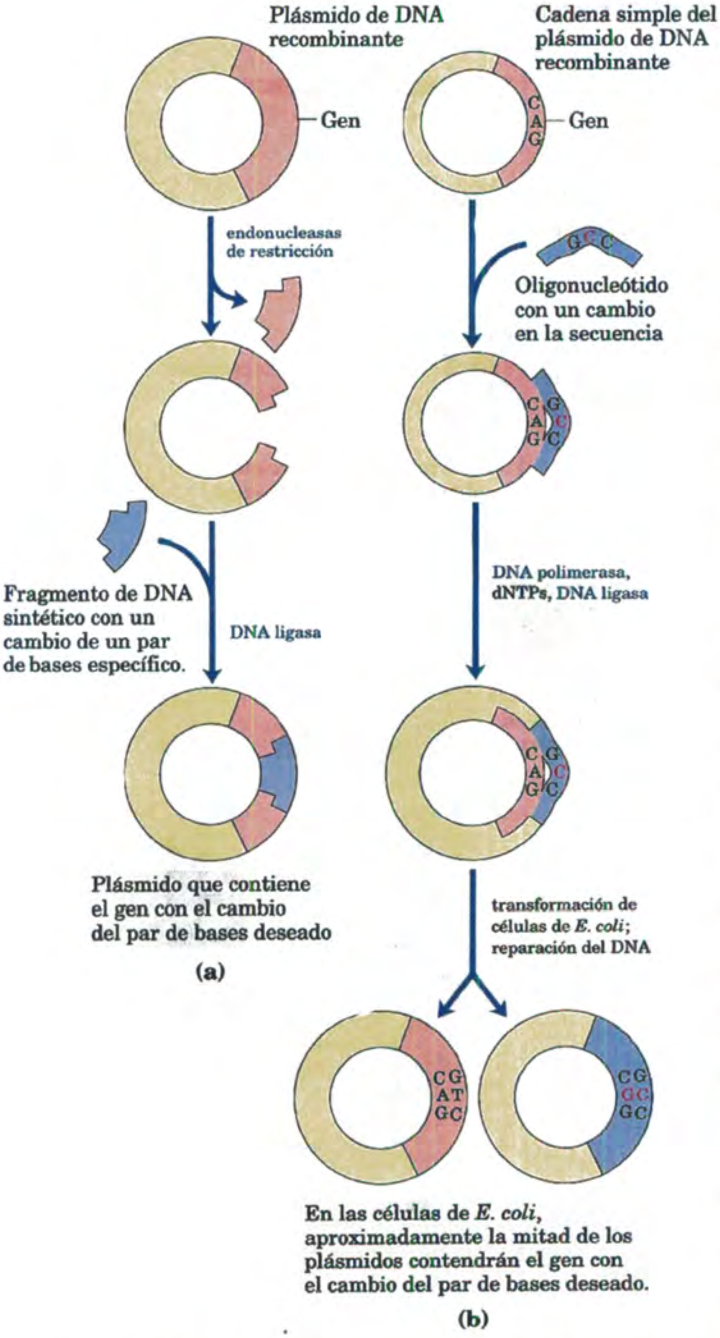


FIGURA 9–11 Dos procedimientos de mutagénesis dirigida. (a) Se sintetiza un segmento de DNA que se utiliza para reemplazar un fragmento de DNA que ha sido eliminado previamente mediante corte con una endonucleasa de restricción. **(b)** Se sintetiza un oligonucleótido con la secuencia deseada con un cambio en una posición. Éste hibrida con una copia monocadena del gen que debe ser modificado y actúa de cebador para la síntesis de un DNA dúplex (con un desapareamiento), que se usa para transformar células. La reparación celular de los desapareamientos producirá el cambio de secuencia deseado en aproximadamente el 50% de los plásmidos.

ciones restantes para formar un gen más pequeño. Se pueden ligar partes de genes diferentes para crear nuevas combinaciones. El producto de este tipo de genes se conoce como **proteína de fusión.**

Se dispone de métodos ingeniosos para realizar prácticamente cualquier tipo de alteración genética in vitro. La reintroducción del DNA alterado en la célula permite investigar las consecuencias de la alteración. La mutagénesis dirigida ha facilitado enormemente la investigación de las proteínas, permitiendo a los investigadores realizar cambios específicos en la estructura primaria de una proteína y examinar los efectos de estos cambios en el plegamiento, la estructura tridimensional y la actividad de la proteína.

Las etiquetas terminales crean sitios de unión para la purificación por afinidad

La cromatografía de afinidad es uno de los métodos más eficientes para la purificación de proteínas (véase la Fig. 3–17c). Lamentablemente hay muchas proteínas sin ligando conocido que pueda ser inmovilizado de manera conveniente sobre un medio cromatográfico. El uso de las proteínas de fusión ha hecho posible purificar prácticamente cualquier proteína por cromatografía de afinidad.

En primer lugar, se acopla el gen que codifica la proteína de interés al gen que codifica un péptido o una proteína que se une a un ligando conocido con elevada afinidad y especificidad. El péptido o proteína usado con este propósito, que puede unirse tanto al extremo amino como al carboxilo, se denomina etiqueta terminal o (más a menudo) simplemente **etiqueta.** Algunas proteínas y péptidos usados frecuentemente como etiquetas se muestran en la Tabla 9–3 junto con sus ligandos.

El procedimiento general se ilustra con la unión de la etiqueta glutatión-*S*-transferasa (GST). La GST es un pequeño enzima (M_r 26.000) que se une fuerte y específicamente a la molécula de glutatión **(Fig. 9–12).** Si la secuencia génica de la GST se une al gen en estudio, la proteína de fusión adquiere la propiedad de unirse al glutatión. La proteína de fusión se expresa en una bacteria o en otro organismo huésped, a partir del cual se prepara un extracto crudo. Se llena una columna con una matriz porosa consistente en el ligando (en este caso, glutatión) inmovilizado sobre las partículas microscópicas de un polímero estable tal como la agarosa entrecruzada. A medida que el extracto crudo fluye a través de la columna, la proteína de fusión queda inmovilizada por unión al glutatión. Las demás proteínas del extracto pasan de largo a través de la columna y son descartadas.

TABLA 9–3 Etiquetas de uso común

Etiqueta proteica/peptídica	Masa molecular (kDa)	Ligando inmovilizado
Proteína A	59	Porción Fc de una IgG
$(His)_6$	0,8	Ni^{2+}
Glutatión-*S*-transferasa (GST)	26	Glutatión
Proteína de unión de maltosa	41	Maltosa
β-Galactosidasa	116	*p*-Aminofenil-β-D-tiogalactósido (TPEG)
Dominio de unión de quitina	5,7	Quitina

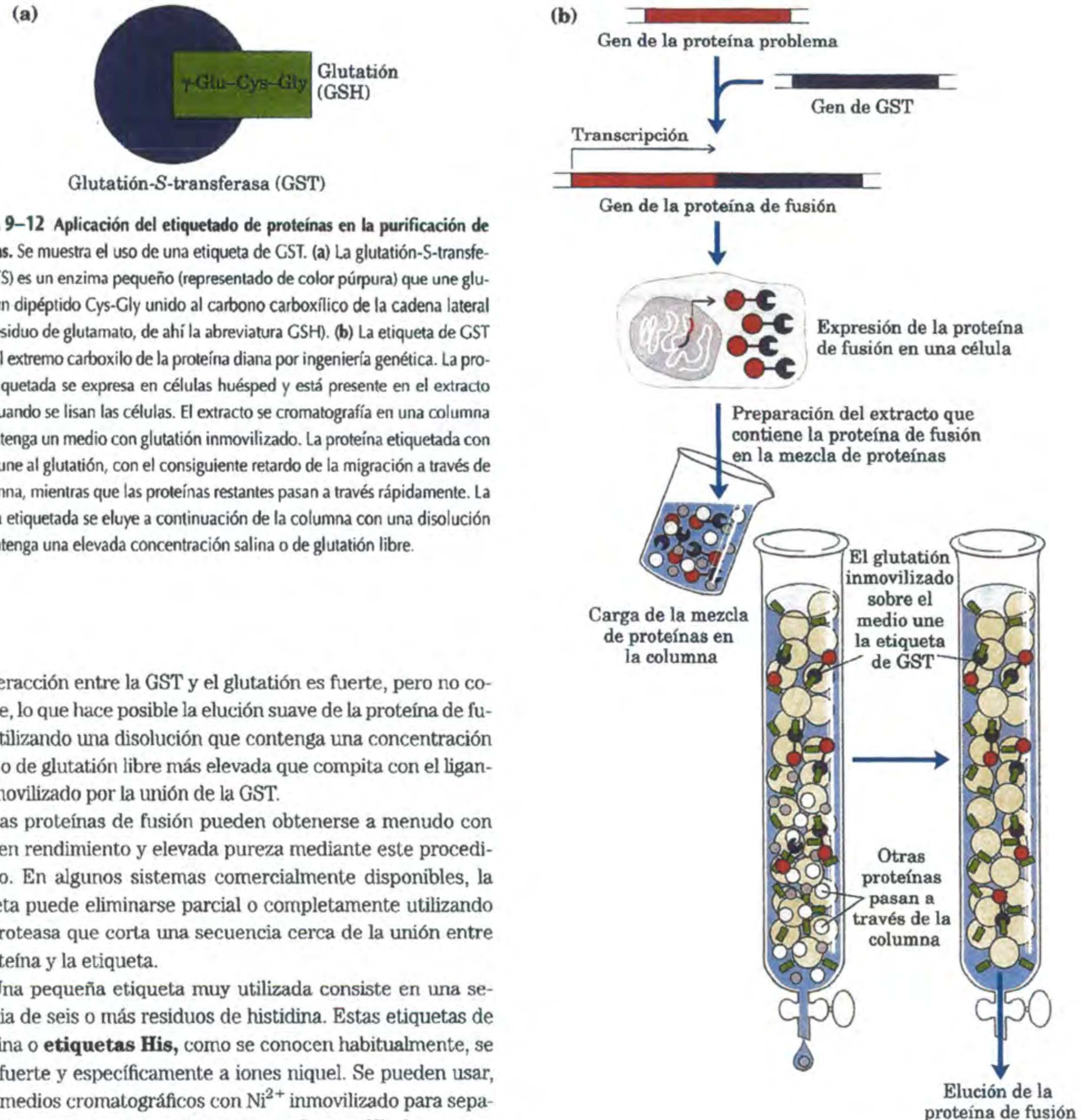


FIGURA 9–12 Aplicación del etiquetado de proteínas en la purificación de proteínas. Se muestra el uso de una etiqueta de GST. **(a)** La glutatión-S-transferasa (GTS) es un enzima pequeño (representado de color púrpura) que une glutatión (un dipéptido Cys-Gly unido al carbono carboxílico de la cadena lateral de un residuo de glutamato, de ahí la abreviatura GSH). **(b)** La etiqueta de GST se une al extremo carboxilo de la proteína diana por ingeniería genética. La proteína etiquetada se expresa en células huésped y está presente en el extracto crudo cuando se lisan las células. El extracto se cromatografía en una columna que contenga un medio con glutatión inmovilizado. La proteína etiquetada con GST se une al glutatión, con el consiguiente retardo de la migración a través de la columna, mientras que las proteínas restantes pasan a través rápidamente. La proteína etiquetada se eluye a continuación de la columna con una disolución que contenga una elevada concentración salina o de glutatión libre.

La interacción entre la GST y el glutatión es fuerte, pero no covalente, lo que hace posible la elución suave de la proteína de fusión utilizando una disolución que contenga una concentración de sal o de glutatión libre más elevada que compita con el ligando inmovilizado por la unión de la GST.

Las proteínas de fusión pueden obtenerse a menudo con un buen rendimiento y elevada pureza mediante este procedimiento. En algunos sistemas comercialmente disponibles, la etiqueta puede eliminarse parcial o completamente utilizando una proteasa que corta una secuencia cerca de la unión entre la proteína y la etiqueta.

Una pequeña etiqueta muy utilizada consiste en una secuencia de seis o más residuos de histidina. Estas etiquetas de histidina o **etiquetas His,** como se conocen habitualmente, se unen fuerte y específicamente a iones níquel. Se pueden usar, pues, medios cromatográficos con Ni^{2+} inmovilizado para separar de forma eficiente proteínas etiquetadas con His de otras en un extracto. Se pueden utilizar etiquetas mayores, tales como la proteína de unión de maltosa, para mejorar la solubilidad y compensar la falta de estabilidad y permitir la purificación de proteínas que no pueden ser purificadas mediante la utilización de otros medios.

La tecnología de etiquetado es conveniente y eficaz, y se ha empleado en millares de estudios publicados. Sin embargo, hay que tomar precauciones al utilizar proteínas etiquetadas. Las etiquetas terminales no son de ningún modo inertes. Incluso las etiquetas más pequeñas pueden afectar las propiedades de las proteínas a las que están unidas e influir en los resultados experimentales. La actividad puede verse afectada incluso cuando las etiquetas se eliminan con proteasas si uno o unos pocos residuos aminoácidos permanecen asociados a la proteína diana. Los resultados obtenidos con proteínas etiquetadas deberían siempre ser evaluados con ayuda de controles bien diseñados para determinar el efecto de la etiqueta en la función de la proteína.

RESUMEN 9.1 Clonación del DNA: fundamentos

- La clonación de DNA y la ingeniería genética requieren el corte del DNA y el ensamblado de segmentos de DNA en nuevas combinaciones: DNA recombinante.
- La clonación incluye el corte del DNA en fragmentos mediante enzimas; la selección y posible modificación del fragmento deseado; la inserción del fragmento de DNA en un vector de clonación adecuado; la transferencia del vector con el inserto de DNA a una célula huésped para su replicación y la selección de las células que contengan el fragmento de DNA.
- Las endonucleasas de restricción (especialmente los enzimas de tipo II) y la DNA ligasa son enzimas esenciales en la clonación.

- Los vectores de clonación consisten en plásmidos, bacteriófagos y, para los insertos de DNA más largos, cromosomas bacterianos artificiales (BAC) y cromosomas artificiales de levadura (YAC).
- Las células que contienen secuencias de DNA específicas se pueden identificar utilizando diversos métodos de hibridación.
- Las técnicas de ingeniería genética permiten manipular las células para que expresen y/o modifiquen los genes clonados.
- Se pueden unir proteínas o péptidos a la proteína de interés alterando el gen clonado para crear una proteína de fusión. Los segmentos proteicos adicionales pueden usarse para detectar la proteína o para purificarla mediante métodos cromatográficos de afinidad apropiados.

9.2 De los genes a los genomas

La **genómica** moderna permite actualmente el estudio del DNA a escala celular, desde los genes individuales hasta el complemento genético completo de un organismo: su genoma. Las bases de datos genómicos crecen rápidamente, a medida que los logros de la secuenciación son continuamente superados por los que llegan a continuación. La biología del siglo XXI avanzará con ayuda de fuentes de información inimaginables hace sólo unos pocos años. A continuación describiremos algunas tecnologías que hacen posibles estos avances.

Las bibliotecas genómicas proporcionan catálogos especializados de información genética

Una genoteca o biblioteca de DNA es una colección de clones de DNA reunidos con objeto de disponer de una fuente de DNA para secuenciar, descubrir nuevos genes o para estudios de la función génica. Hay distintos tipos de genotecas según el origen del DNA. Entre las mayores se encuentran las **bibliotecas genómicas,** producidas cuando el genoma completo de un organismo particular se corta en millares de fragmentos y *todos* ellos son clonados por inserción en un vector de clonación.

El primer paso en la preparación de una genoteca es la digestión parcial del DNA con endonucleasas de restricción, de forma que cualquier secuencia se encontrará en fragmentos de una gama de tamaño, gama compatible con el vector de clonación, lo que asegura que virtualmente todas las secuencias estén representadas en los clones de la genoteca. Los fragmentos que son demasiado grandes o demasiado pequeños para la clonación se eliminan por centrifugación o electroforesis. El vector de clonación, tal como un plásmido BAC o YAC, se corta con la misma endonucleasa de restricción y se liga con los fragmentos de DNA genómico. La mezcla de ligación se usa a continuación para transformar células bacterianas o de levadura para preparar una genoteca de tipos celulares, cada una de ellas con una molécula de DNA recombinante distinta. Idealmente, todo el DNA del genoma estudiado estará representado en la genoteca. Cada célula bacteriana o de levadura transformada forma una colonia, o "clon" de células idénticas, cada una con el mismo plásmido recombinante, uno de los muchos contenidos en el conjunto de la genoteca.

Los clones individuales de una genoteca se pueden ordenar identificando clones con secuencias solapadas, mediante métodos de hibridación. Un conjunto de clones solapados constituye un catálogo de un largo segmento continuo de un genoma, a menudo designado como **cóntigo (Fig. 9–13)**. Secuencias previamente estudiadas o genes enteros pueden ser ubicados dentro de la genoteca mediante métodos de hibridación para determinar qué clones de la genoteca contienen la secuencia conocida. Si la secuencia ha sido previamente cartografiada en un cromosoma, se puede determinar perfectamente la localización (dentro del genoma) del DNA clonado y de cualquier cóntigo del cual forme parte. Una genoteca bien caracterizada puede contener millares de largos cóntigos, todos ellos asignados y ordenados en cromosomas específicos para formar un mapa físico detallado. Las secuencias conocidas de la genoteca (denominadas **sitios identificados por secuencia,** o abreviado **STS**) pueden servir de referencia en proyectos de secuenciación genómica.

A medida que se conocen más y más secuencias genómicas, la utilidad de las genotecas genómicas disminuye en favor de genotecas más especializadas, orientadas al estudio de la función génica. Este es, por ejemplo, el caso de una genoteca que contenga solamente los genes que se *expresan* —es decir, que se transcriben en RNA— en un organismo o incluso en ciertas células o tejidos. Una genoteca de este tipo se concentra en aquellas porciones de un genoma implicadas en la función de un tejido o tipo celular. En primer lugar, se extrae el mRNA de

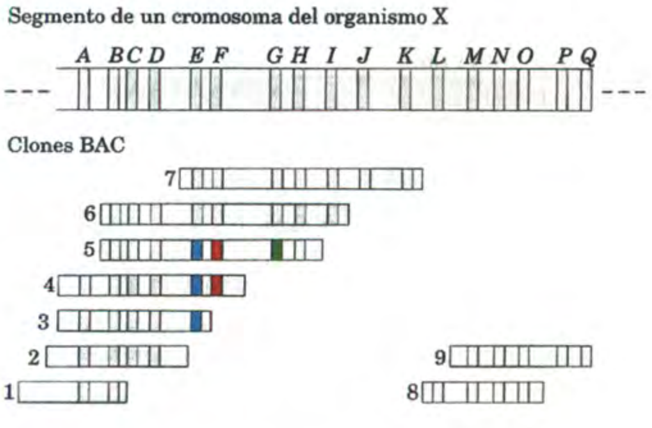


FIGURA 9–13 Ordenación de los clones de una genoteca de DNA. Se representa el fragmento de un cromosoma de un organismo hipotético X, con marcadores de A a Q, que representan sitios de identificación por secuencia (STS: segmentos de DNA de secuencia conocida, entre los que se encuentran genes conocidos). Debajo del cromosoma se muestra una serie de clones BAC ordenados, numerados del 1 al 9. La ordenación de los clones en el mapa genético es un proceso con muchos pasos. La presencia o ausencia de un STS en un clon individual puede determinarse por hibridación —por ejemplo examinando cada clon con un DNA complementario a un STS—. Una vez el STS de cada clon BAC ha sido identificado (así como los propios STS si su locación es todavía desconocida), los clones pueden ordenarse en el mapa. Por ejemplo, compare los clones 3, 4 y 5. El marcador *E* (azul) se encuentra en los tres clones; *F* (rojo) en los clones 4 y 5, pero no en el 3, y *G* (verde) sólo en el clon 5. Ello indica que el orden de los sitios es *E, F, G*. Los clones están parcialmente solapados y su orden debe ser 3, 4, 5. La serie ordenada de clones resultante se denomina cóntigo.

un organismo o de determinadas células del organismo, y se sintetizan **DNA complementarios (cDNA)** a partir del RNA, en una reacción de varios pasos catalizada por la transcriptasa inversa **(Fig. 9–14)**. Los fragmentos de DNA de doble hebra resultantes se insertan en un vector adecuado y se clonan, generándose así una población de clones denominada **genoteca de cDNA.** La búsqueda de un gen concreto es más fácil en una genoteca preparada a partir de los mRNA de una célula de la que se sabe que expresa este gen. Por ejemplo, la clonación de los genes de las globinas puede ser más sencilla a partir de una genoteca de cDNA de las células precursoras de los eritrocitos, en las cuales aproximadamente la mitad de los mRNA codifican globinas. Para facilitar la cartografía de los grandes genomas, se puede secuenciar parcialmente al azar una genoteca de cDNA para obtener un tipo muy útil de STS, denominada **secuencia de identificación expresada (EST).** Las EST, de tamaños desde unas pocas docenas de pares de bases a varios centenares, se pueden situar en el mapa genómico general, proporcionando marcadores para los genes expresados. Centenares de miles de EST fueron incorporadas a los mapas físicos detallados utilizados como guía en la secuenciación del genoma humano.

Una genoteca de cDNA puede estar todavía más especializada si se clona un cDNA o un fragmento de cDNA en un vector que empalme cada secuencia del cDNA con la secuencia de un gen marcador; los genes fusionados forman un "constructo identificador". Dos marcadores útiles son los genes de la proteína fluorescente verde y los epítopos de identificación. Un gen empalmado con el gen de la **proteína fluorescente verde (GFP)** genera una proteína de fusión muy fluorescente

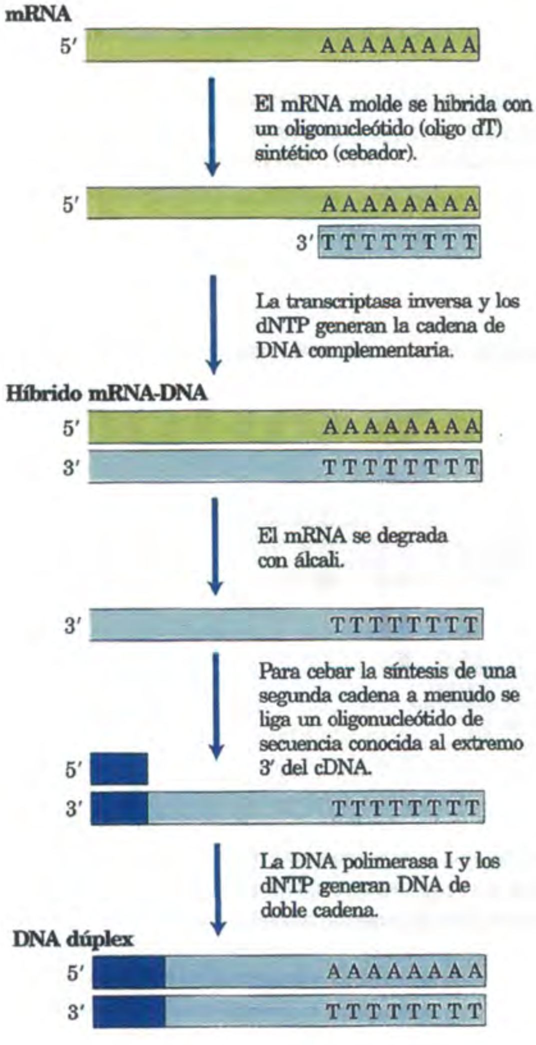


FIGURA 9–14 Construcción de una genoteca de cDNA a partir de mRNA. El mRNA de una célula contiene los transcritos de miles de genes, y los cDNA generados son, en consecuencia, heterogéneos. El DNA dúplex producido de este modo se inserta en un vector de clonación adecuado. La transcriptasa inversa puede sintetizar DNA sobre un molde de RNA o de DNA (véase la Fig. 26–33).

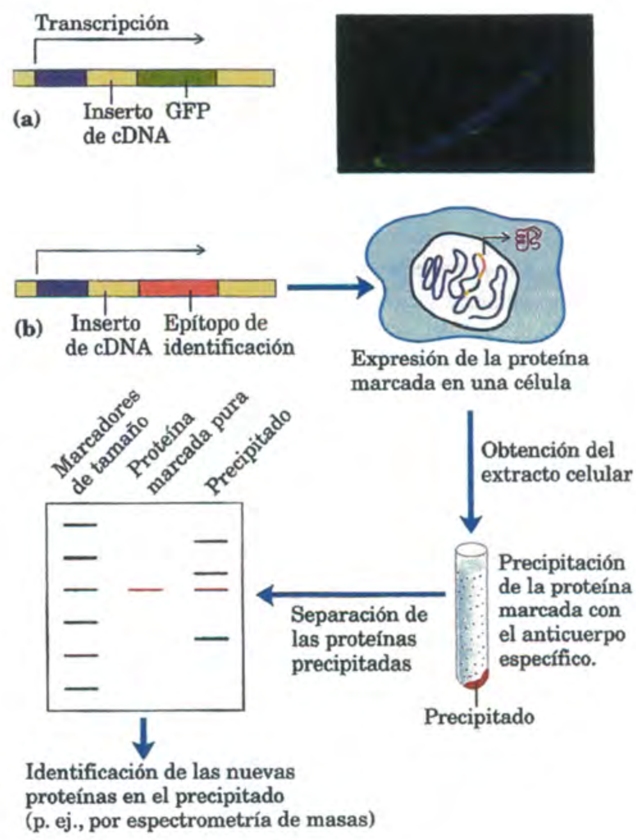


FIGURA 9–15 Genotecas de DNA especializadas. (a) El clonaje de un cDNA junto al gen de la proteína fluorescente verde (GFP) crea una construcción etiquetada. La transcripción de RNA avanza a lo largo del gen de interés (DNA insertado) y del gen marcador y el transcrito de mRNA se expresa como una proteína de fusión. La parte de proteína correspondiente a GFP es visible en el microscopio de fluorescencia. La fotografía muestra un gusano nemátodo que contiene una proteína de fusión con GFP que sólo se expresa en las cuatro neuronas del "tacto" que se encuentran a lo largo del cuerpo. **Construcciones etiquetadas (b)** Si el cDNA se clona junto al gen de un epítopo de identificación, la proteína de fusión resultante puede precipitarse con anticuerpos contra el epítopo. Cualquier otra proteína que interaccione con la proteína marcada también precipitará, lo que ayuda a identificar las interacciones proteína-proteína.

(Fig. 9–15a). La GFP procede de la medusa *Aequorea victoria*, tiene una estructura en barril-β, con un fluoróforo en el centro del barril (véase el Recuadro 12–3, p. 434). El fluoróforo procede de la reorganización y oxidación de varios aminoácidos en una reacción autocatalítica que únicamente requiere oxígeno molecular (véase el Recuadro 12–3, Fig. 3). Por tanto, la proteína es fácilmente clonada en forma activa en prácticamente cualquier célula. Con el microscopio se pueden observar unas pocas moléculas de esta proteína, para el estudio de su localización y movimientos en la célula. Se han generado mutantes de la GFP de diferentes colores y propiedades (brillantez, estabilidad) y se han aislado proteínas análogas de otras especies.

Un **epítopo de identificación** es una corta secuencia proteica reconocida con elevada afinidad por un anticuerpo monoclonal bien caracterizado (p. 173). La proteína marcada puede ser precipitada específicamente a partir de un extracto crudo de proteína por interacción con el anticuerpo (Fig. 9–15b). Si cualquier otra proteína se une a la proteína marcada, también precipitará, obteniéndose de este modo información sobre las interacciones proteína-proteína que tiene lugar en la célula. La diversidad y utilidad de las genotecas especializadas de DNA (y de las proteínas etiquetadas) está creciendo de año en año.

La reacción en cadena de la polimerasa amplifica secuencias de DNA específicas

El Proyecto del Genoma Humano, junto con otros muchos esfuerzos dirigidos a la secuenciación de los genomas de organismos de todo tipo, está suministrando información sin precedentes sobre la secuencia de los genes. Éstas, a su vez, han simplificado el proceso de clonación de genes individuales para un análisis bioquímico más detallado. Si se conoce al menos la secuencia de los flancos del segmento de DNA que se desea clonar, el número de copias de este segmento de DNA puede ser amplificado enormemente por medio de la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR),** técnica ideada por Kary Mullys en 1983. El DNA amplificado puede ser clonado directamente o usado en una amplia variedad de procedimientos analíticos.

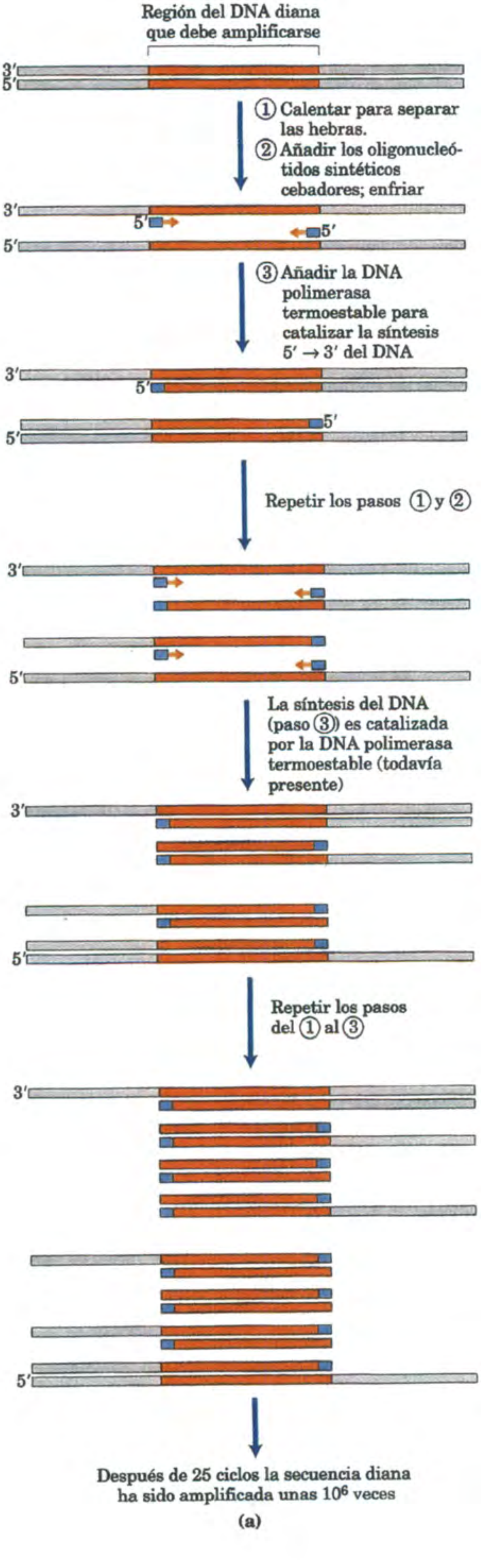
La PCR es una técnica de una gran simplicidad. Se preparan dos oligonucleótidos sintéticos, cada uno complementario de secuencias en las hebras opuestas del DNA diana, situadas justo en los extremos del segmento que se quiere amplificar. Los oligonucleótidos sirven de cebadores para la replicación, con los extremos 3′ de las sondas hibridadas orientados uno hacia otro y posicionados para cebar la síntesis a lo largo del segmento de DNA deseado **(Fig. 9–16)**. (Las DNA polimerasas sintetizan la hebras de DNA a partir de desoxirribonucleótidos, utilizando un molde de DNA, según se describe en el Capítulo 25.) El DNA aislado que contiene el segmento que se desea amplificar se calienta brevemente para desnaturalizarlo y a continuación se enfría en presencia de un gran exceso de los oligonucleótidos sintéticos que actúan a modo de cebadores. A continuación se añaden los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato, y el segmento de DNA que ha sido cebado es replicado selectivamente. El ciclo de calentamiento, enfriamiento y replicación se repite 25 o 30 veces en unas pocas horas por medio de un proceso automatizado que amplifica el segmento de DNA flanqueado por los cebadores hasta que pueda ser analizado o clonado fácilmente. En la PCR se emplean DNA polimerasas termoestables, tales como la polimerasa *Taq* (obtenida de una bacteria que vive a unos 90 °C). El enzima permanece activo después de cada paso de calentamiento y no tiene que ser reemplazado. El diseño cuidadoso de los cebadores utilizados en la PCR, introduciendo, por ejemplo, lugares de corte para enzimas de restricción, puede facilitar la ulterior clonación del DNA amplificado (Fig. 9–16b).

Esta tecnología posee una gran sensibilidad: la PCR puede detectar y amplificar hasta una sola molécula de DNA en casi cualquier tipo de muestra. Aunque el DNA se degrada lentamente con el tiempo (p. 289), con ayuda de la PCR se ha logrado clonar DNA de más de 40.000 años de antigüedad. Esta técnica se ha utilizado para clonar fragmentos de DNA procedentes de restos humanos momificados y de animales extintos tales como los mamuts; se han abierto así nuevas posibilidades para la arqueología y la paleontología moleculares. Se ha amplificado el DNA de sitios de enterramiento con la PCR y se ha usado para seguir antiguas migraciones humanas. La epidemiología puede utilizar muestras amplificadas por la PCR a partir de restos humanos para seguir la evolución de virus humanos patógenos. Además de su utilidad para clonar DNA, la PCR es una poderosa herramienta en medicina forense (Recuadro 9–1). También está siendo utilizada en la detección de infecciones víricas antes de la aparición de los primeros síntomas y en el diagnóstico prenatal de una amplia variedad de enfermedades genéticas.

El método de la PCR también es importante para el progreso de la secuenciación de genomas completos. Por ejemplo, el cartografiado de los marcadores de secuencia expresados en un cromosoma particular a menudo implica la amplificación de los ETS por PCR, seguida de hibridación del DNA amplificado con clones de una genoteca ordenada. En el Proyecto del Genoma Humano se desarrollaron muchas otras aplicaciones de la PCR, que examinaremos a continuación.

Secuenciación de genomas enteros

El genoma es la fuente de información básica sobre un organismo, y naturalmente el que suscita mayor interés es el nuestro. Menos de diez años después del desarrollo de métodos de secuenciación del DNA eficaces, se empezó a discutir seriamente sobre las posibilidades de secuenciar en su totalidad los tres mil millones de pares de bases del genoma humano. El Proyecto Genoma Humano surgió de una iniciativa internacional dotada de un presupuesto considerable y dio sus primeros pasos a finales de la década de 1980. Este esfuerzo aglutinó contribuciones importantes de 20 centros de secuenciación pertenecientes a seis naciones: Estados Unidos, Gran Bretaña, Japón, Francia, China y Alemania. La coordinación general corrió a cargo de la Oficina de Investigación Genómica de los Institutos Nacionales de la Salud, dirigida primero por James Watson y después de 1992 por Francis Collins. Al principio, la secuenciación de un genoma de 3×10^9 pares de bases parecía una tarea irrealizable, pero poco a poco los avances tecnológicos la hicieron posible. La secuencia completa del genoma humano fue publicada en abril de 2003, varios años antes de lo previsto.



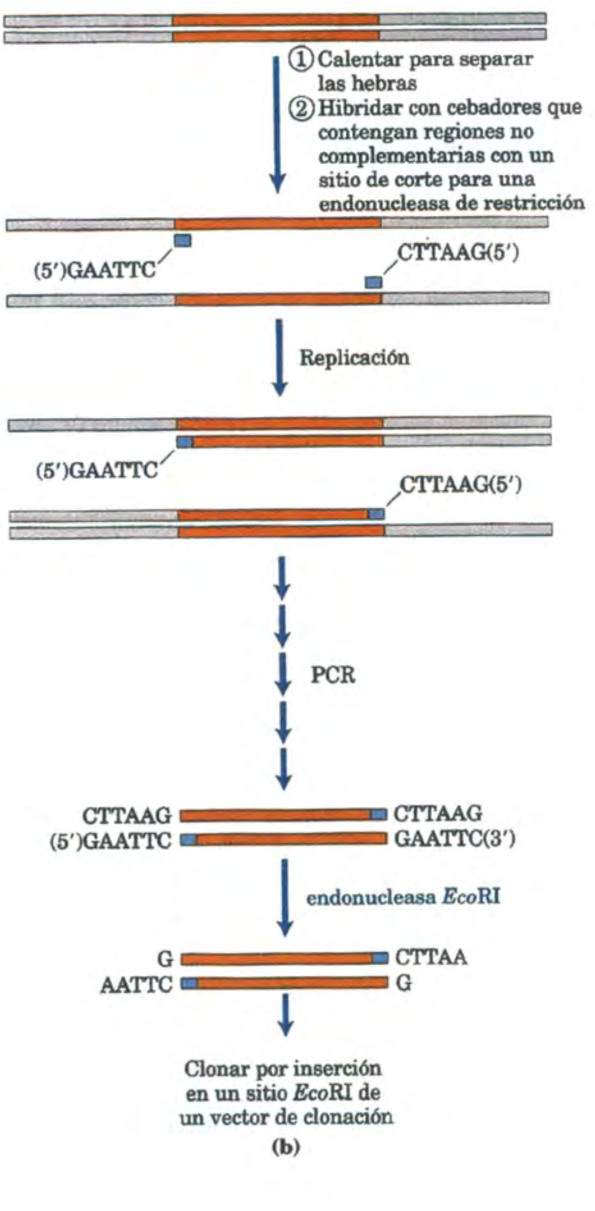


FIGURA 9–16 Amplificación de un fragmento de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa. (a) El procedimiento de la PCR tiene tres pasos. ① Se separan las cadenas de DNA por calentamiento, a continuación ② se hibridan con un exceso de cebadores de DNA sintético cortos (azul), que flanquean la región que se desea amplificar; ③ el DNA nuevo se sintetiza por polimerización. Los tres pasos se repiten unos 25 o 30 ciclos. La DNA polimerasa termoestable *TaqI* (de *Thermus aquaticus*, una especie bacteriana que vive en manantiales de agua caliente) no se desnaturaliza en las etapas de calentamiento. **(b)** El DNA amplificado por PCR puede ser clonado. Los cebadores pueden incorporar DNA no complementario en los extremos que contenga el sitio de corte de una endonucleasa de restricción. Aunque estas partes de los cebadores no se aparean con el DNA diana, el proceso de la PCR los incorpora en el DNA que es amplificado. El corte de los fragmentos amplificados en estos sitios crea extremos cohesivos que facilitan la ligación del DNA amplificado en un vector de clonación. **Reacción en cadena de la polimerasa**

RECUADRO 9–1 Una arma poderosa para la medicina forense

Tradicionalmente, uno de los métodos más exactos para situar a un individuo en la escena de un crimen ha sido la toma de huellas dactilares. Un método basado en las técnicas del DNA recombinante, denominado la **huella dactilar de DNA** (también denominado tipificación del DNA), puede ser más poderoso que cualquier otro método de identificación. El método fue descrito por primera vez por el genético inglés Alec Jeffreys en 1985.

La determinación de la huella dactilar del DNA se basa en los **polimorfismos de secuencia.** Se trata de pequeñas diferencias en las secuencias entre individuos, que se presentan, como promedio, una vez cada 1.000 de pares de bases. Cada diferencia con respecto a la secuencia consenso del genoma humano (el primero en ser obtenido) está presente en una parte de la población, pero todos los individuos presentan algunas. Algunos de los cambios de secuencia afectan a dianas de enzimas de restricción, originando diferencias individuales en los tamaños de los fragmentos de DNA producidos por digestión con un enzima de restricción determinado. Estas variaciones dan lugar a los **polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).** Otro tipo de variación de secuencia, que es la más usada en la actualidad en la tipificación del DNA, afecta a las **repeticiones cortas en tándem (STR).**

La detección de RFLP se basa en un procedimiento especial de hibridación llamado **transferencia Southern** (Fig. 1). Fragmentos de DNA procedentes de la digestión del DNA genómico con endonucleasas de restricción se separan según su tamaño por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de DNA se desnaturalizan por inmersión del gel en álcali y, a continuación, se transfieren a una membrana de nilón para reproducir la distribución de fragmentos en el gel. A continuación la membrana se sumerge en una disolución que contenga una sonda de DNA marcada con radiactividad. La sonda de una secuencia que se repita varias veces en el genoma humano generalmente identifica unos pocos de los millares de fragmentos de DNA generados cuando el genoma humano es digerido con una endonucleasa de restricción. Los fragmentos que hibridan con la sonda se revelan

(continúa en la página siguiente)

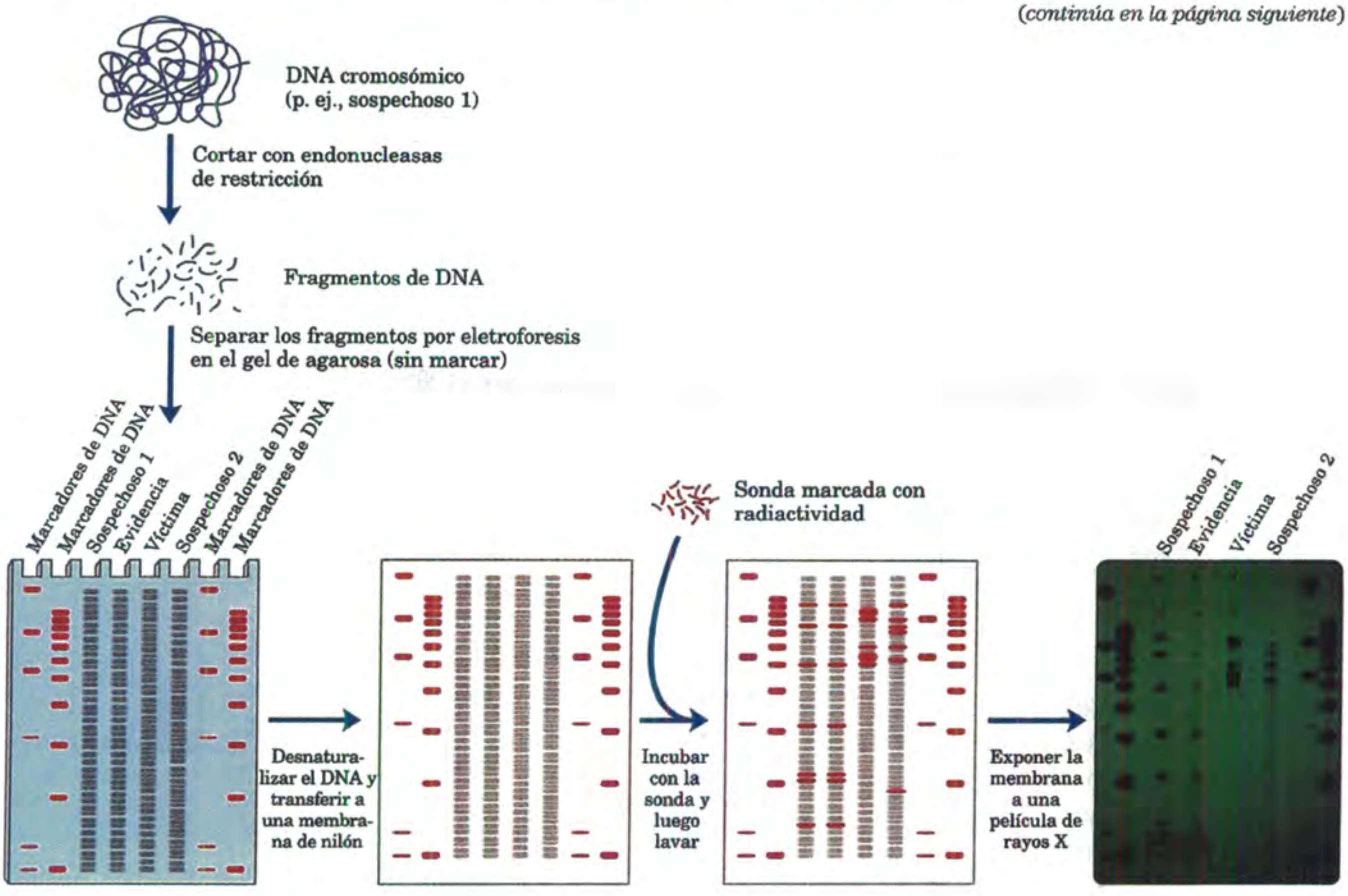


FIGURA 1 La transferencia Southern aplicada a la determinación de la huella dactilar de RFLP del DNA. La transferencia Southern (con muchas aplicaciones en biología molecular) toma el nombre de Jeremy Southern que desarrolló la técnica. En este ejemplo de aplicación forense, el DNA de una muestra de semen procedente de una víctima de violación y asesinato se comparó con muestras de DNA de la víctima y dos sospechosos. Se obtuvieron fragmentos de cada muestra que se separaron por electroforesis en gel. Se usaron sondas de DNA radiactivas para identificar un pequeño subconjunto de fragmentos que contenían secuencias complementarias de la sonda. Los tamaños de los fragmentos identificados variaban de un individuo a otro, como puede observarse en los patrones de los tres individuos examinados (la víctima y dos sospechosos). Uno de los sospechosos muestra un patrón de bandas de DNA idéntico al de la muestra de semen procedente de la víctima.

RECUADRO 9–1 Una arma poderosa para la medicina forense (*continuación de la página anterior*)

por autorradiografía, como en la Figura 1. El método es muy preciso y fue usado por primera vez en casos penales a finales de la década de 1980. Sin embargo, requiere una cantidad importante de DNA no degradado (>25 ng), que a menudo no se encuentra en la escena de un crimen o en el escenario de una catástrofe.

La necesidad de métodos más sensibles de tipificación del DNA llevó a dirigir la atención hacia la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véase la Fig. 9–16) y las STR. Un locus STR es una secuencia de DNA corta repetida muchas veces en tándem en un lugar determinado de un cromosoma; comúnmente las secuencias repetidas tienen 4 pb de longitud. Los loci STR más útiles para el tipificado del DNA son bastante cortos, de 4 a 50 repeticiones (un total de 16 a 200 pares de bases para repeticiones de cuatro nucleótidos) y presentan múltiples variantes de longitud en la población humana. Más de 20.000 loci STR de tetranucleótidos han sido caracterizados en el genoma humano. Más de un millón de STR de todo tipo pueden estar presentes en el genoma humano, representando alrededor del 3% de todo el DNA humano.

La reacción en cadena de la polimerasa es de fácil aplicación al análisis de las STR, y las preferencias de los científicos forenses se desplazaron de los RFLP a las STR cuando las promesas de una mayor sensibilidad se confirmaron a principios de la década de 1990. Las secuencias de DNA que flanquean las STR son únicas para cada tipo de STR e idénticas (excepto en casos muy raros) para todos los humanos. Los cebadores para la PCR son complementarios del DNA flanqueante y están diseñados para amplificar la STR (Fig. 2a). La longitud del producto de la PCR refleja, pues, la longitud de la STR de la muestra. Puesto que cada ser humano hereda un cromosoma de cada progenitor, las longitudes de la STR de los dos cromosomas son a menudo diferentes y dan lugar a dos señales para cada individuo. Si se analizan múltiples loci STR puede generarse un perfil que es esencialmente único para un individuo en particular. La amplificación por PCR permite obtener huellas de DNA a partir de menos de 1 ng de DNA parcialmente degradado, cantidad que puede obtenerse de un único folículo piloso, una gota de sangre, una pequeña muestra de semen de una sábana o muestras que pueden tener meses o incluso años.

El éxito del uso forense del análisis de STR requiere su estandarización. El primer estándar forense de STR se estableció en el Reino Unido en 1995. El estándar de Estados Unidos, denominado Sistema de Indexado Combinado de DNA (CODIS), se estableció en 1998. El sistema CODIS se basa en 13 loci STR bien estudiados (Tabla 1), que deben estar presentes en cualquier experimento de tipificación de DNA realizado en Estados Unidos. El gen de la amelogenina también se usa de marcador. Este gen, presente en los cromosomas sexuales humanos, tiene secuencias flaqueantes ligeramente diferentes en los cromosomas X e Y. La amplificación por PCR a lo largo del gen de la amilogenina genera, por lo tanto, productos de diferente tamaño que pueden revelar el sexo del donante de DNA. La base de datos de CODIS contenía 2,8 millones de muestras antes de 2006 y

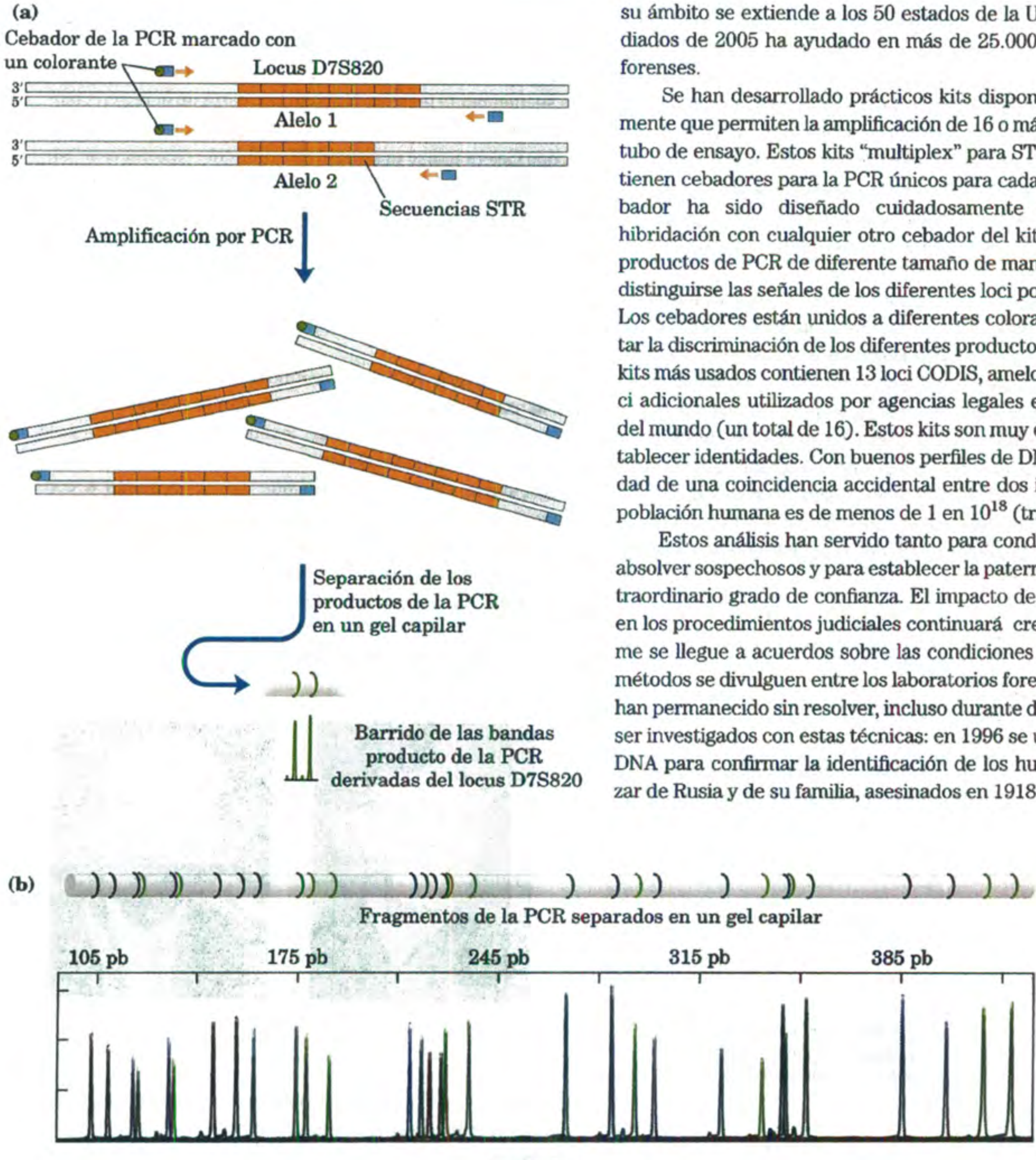
TABLA 1 Propiedades de los loci utilizados en la base de datos CODIS

Locus	Cromosoma	Motivo repetido	Longitud repetida (gama)*	Número de alelos observados†
CSF1PO	5	TAGA	5–16	20
FGA	4	CTTT	12,2–51,2	80
TH01	11	TCAT	3–14	20
TPOX	2	GAAT	4–16	15
VWA	12	[TCTG][TCTA]	10–25	28
D3S1358	3	[TCTG][TCTA]	8–21	24
D5S818	5	AGAT	7–18	15
D7S820	7	GATA	5–16	30
D8S1179	8	[TCTA][TCTG]	7–20	17
D13S317	13	TATC	5–16	17
D16S539	16	GATA	5–16	19
D18S51	18	AGAA	7–39,2	51
D21S11	21	[TCTA][TCTG]	12–41,2	82
Amelogenina	X,Y	No aplicable		

Fuente: adaptado de Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 12ª edn, Academic Press, San Diego, p. 96.

*Longitud de las repeticiones observadas en la población humana. En algunos alelos pueden haber repeticiones parciales o imperfectas.

†Número de alelos diferentes observados hasta el presente en la población humana. El análisis detallado de un locus en muchos individuos es un prerrequisito para su utilización en la tipificación forense.



su ámbito se extiende a los 50 estados de la Unión. Hasta mediados de 2005 ha ayudado en más de 25.000 investigaciones forenses.

Se han desarrollado prácticos kits disponibles comercialmente que permiten la amplificación de 16 o más loci STR en un tubo de ensayo. Estos kits "multiplex" para STR (Fig. 2b) contienen cebadores para la PCR únicos para cada locus. Cada cebador ha sido diseñado cuidadosamente para evitar la hibridación con cualquier otro cebador del kit y para generar productos de PCR de diferente tamaño de manera que puedan distinguirse las señales de los diferentes loci por electroforesis. Los cebadores están unidos a diferentes colorantes para facilitar la discriminación de los diferentes productos de la PCR. Los kits más usados contienen 13 loci CODIS, amelogenina y dos loci adicionales utilizados por agencias legales en otros lugares del mundo (un total de 16). Estos kits son muy eficaces para establecer identidades. Con buenos perfiles de DNA, la probabilidad de una coincidencia accidental entre dos individuos en la población humana es de menos de 1 en 10^{18} (trillón).

Estos análisis han servido tanto para condenar como para absolver sospechosos y para establecer la paternidad con un extraordinario grado de confianza. El impacto de esta tecnología en los procedimientos judiciales continuará creciendo, conforme se llegue a acuerdos sobre las condiciones de su uso y los métodos se divulguen entre los laboratorios forenses. Casos que han permanecido sin resolver, incluso durante décadas, pueden ser investigados con estas técnicas: en 1996 se usó la huella del DNA para confirmar la identificación de los huesos del último zar de Rusia y de su familia, asesinados en 1918.

FIGURA 2 Análisis por PCR de un locus STR. (a) Se diseñan cebadores para la PCR para amplificar un segmento que contenga la región repetitiva. Uno de los dos cebadores está unido a un colorante fluorescente (círculo verde). Los dos cromosomas de un individuo pueden tener alelos diferentes con un número diferente de repeticiones en el mismo locus. La PCR generará por tanto dos productos de tamaño ligeramente diferente. Estos se analizan por electroforesis capilar en gel de poliacrilamida. Las bandas fluorescentes se analizan con un láser de barrido que genera una serie de picos que combinados con los marcadores de tamaño adecuados indica con precisión el tamaño de cada fragmento de la PCR y por lo tanto la longitud de la STR en el alelo correspondiente. **(b)** La combinación de los productos de la PCR de múltiples loci genera un patrón múltiplex como el mostrado (en este caso, un patrón con 16 loci, denominado un 16-plex, generado usando un kit comercial de análisis de STR). Éste requiere múltiples conjuntos de cebadores para la PCR, cada uno dirigido a un locus distinto. Para distinguir más fácilmente los diferentes loci, los colorantes unidos a los cebadores de la PCR tienen varios colores distintos. Además, los cebadores de la PCR para un locus determinado se diseñan de modo que produzcan productos de tamaño tan diferente como sea posible de los generados por los cebadores usados en otros loci.

Este logro fue el resultado de un esfuerzo internacional cuidadosamente planificado a lo largo de 14 años. Los equipos de investigación primero confeccionaron un mapa físico detallado del genoma humano, con clones procedentes de cada uno de los cromosomas organizados en largos cóntigos **(Fig. 9–17)**. Cada cóntigo contenía marcadores del tipo STS cada 100.000 pares de bases como máximo. El genoma así cartografiado pudo dividirse entre los diferentes centros internacionales, para secuenciar los clones en BAC o YAC de los segmentos particulares del genoma que les correspondieron. Puesto que muchos de los clones tenían más de 100.000 pares de bases de longitud, y las modernas técnicas de secuenciación pueden resolver sólo de 600 a 750 pares de bases de una vez, cada clon tuvo que ser secuenciado a trozos.

La estrategia de secuenciación fue una aproximación al azar, con ayuda de nuevos secuenciadores automáticos muy eficaces, consistente en secuenciar fragmentos al azar de un clon determinado. La secuencia del clon completo se ensamblaba mediante la identificación de los solapamientos asistida por ordenador. El número de trozos de clon secuenciados se determinó estadísticamente, de modo que la longitud completa del clon fue secuenciada de cuatro a seis veces, como promedio. Las secuencias eran introducidas en un banco de datos que cubría el genoma completo. La construcción del mapa físico fue una larga tarea, cuyo progreso fue reflejado en los informes anuales de las principales publicaciones científicas a lo largo de la década de 1990, al final de la cual el mapa estaba prácticamente terminado. La finalización del proyecto de secuenciación estaba prevista para el año 2005, pero las circunstancias y la tecnología hicieron posible acelerar el proceso.

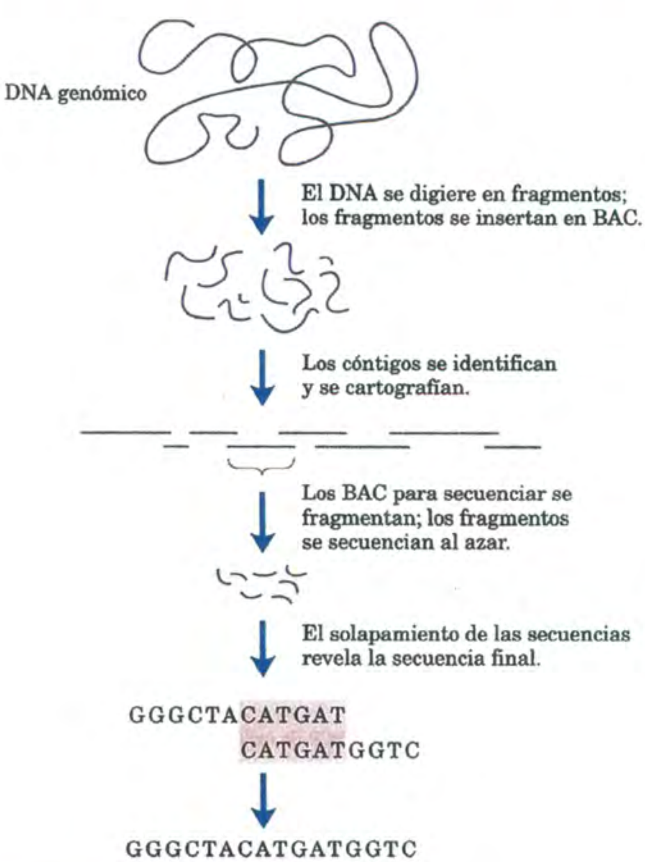


FIGURA 9–17 La estrategia del Proyecto Genoma Humano. Los clones aislados de una genoteca genómica se ordenaron en un mapa físico detallado; a continuación, los clones individuales fueron secuenciados mediante protocolos de secuenciación al azar. La estrategia utilizada en el proyecto privado prescindió de la elaboración del mapa físico y secuenció el genoma entero mediante clonación al azar.

En 1997 se produjo una iniciativa comercial competitiva para secuenciar el genoma humano por parte de la recién creada compañía Celera Corporation. Dirigida por J. Craig Venter, el grupo Celera utilizó una estrategia diferente denominada "secuenciación al azar del genoma entero", que elimina la necesidad de confeccionar un mapa físico del genoma. El método consiste en secuenciar fragmentos al azar de todo el genoma. Los segmentos secuenciados se ordenan gracias a la identificación de los solapamientos asistida por ordenador (con la referencia, no obstante, del mapa físico detallado elaborado por el proyecto público).

En los inicios del Proyecto Genoma Humano, la secuenciación al azar a esta escala fue descartada por considerarse impracticable. Sin embargo, los avances informáticos y la automatización de la secuenciación hicieron posible esta metodología hacia 1997. La carrera que se desencadenó a continuación entre la iniciativa pública y la privada acortó considerablemente el tiempo previsto para completar el proyecto. La publicación del borrador de la secuencia del genoma humano en 2001 fue seguida por dos años de trabajo para eliminar cerca de un millar de discontinuidades y así disponer de secuencias de alta calidad en la totalidad del genoma.

Francis S. Collins

J. Craig Venter

El Proyecto Genoma Humano es la culminación de la biología del siglo XX y ofrece perspectivas científicas profundamente renovadas para el nuevo siglo. El genoma humano es sólo parte del esfuerzo emprendido, pues los genomas de muchas otras especies están siendo (o han sido) secuenciados, entre los que se encuentran las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (completado en 1996) y *Schizosaccharomyces pombe* (2002), el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (1998), la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (2000), la planta *Arabidopsis thaliana* (2000), el ratón *Mus musculus* (2002) y centenares de bacterias y arqueobacterias **(Fig. 9–18)**. La mayoría de los esfuerzos iniciales se dedicaron a especies habitualmente usadas en el laboratorio. Sin embargo, la tecnología continúa mejorando y cuando este libro vea la luz se conocerán las secuencias genómicas completas de más de 1.200 organismos de todo tipo. Actualmente son numerosos los esfuerzos encaminados a car-

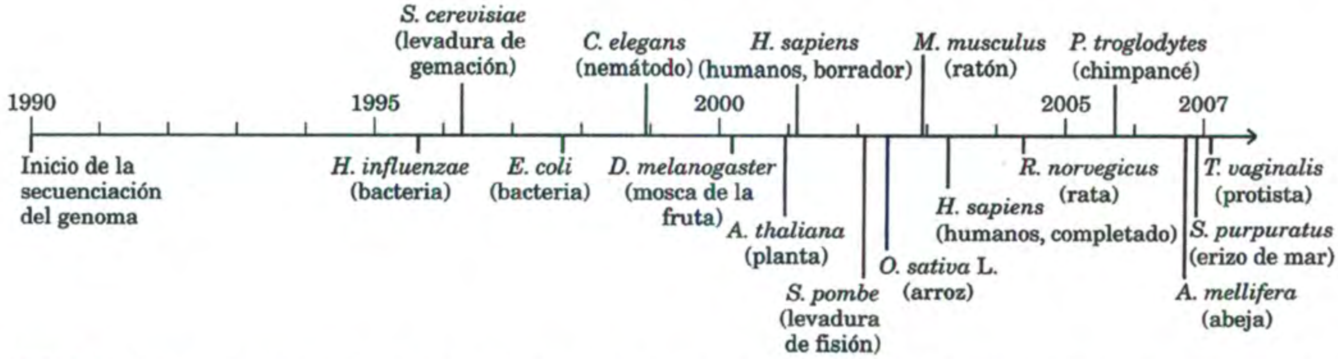


FIGURA 9–18 Cronología de la secuenciación genómica. El debate a mediados de la década de 1980 desembocó en el inicio del proyecto en 1989. El trabajo preparatorio, en el que figuraba el cartografiado exhaustivo para disponer de referencias en el genoma, ocupó buena parte de la década de 1990. Se iniciaron diferentes proyectos para secuenciar los genomas de otros organismos importantes para la investigación. Entre las primeras secuencias completadas se encontraban muchas especies bacterianas (tales como *Haemophilus influenzae*), la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), gusanos nemátodos (*Caenorhabditis elegans*), insectos (*Dosophila melanogaster* y *Apis mellifera*), plantas (*Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa L.*), roedores (*Mus musculus* y *Rattus norvegicus*), primates (*Homo sapiens* y *Pan troglodytes*) y algunos patógenos humanos (p. ej., *Trichomonas vaginalis*). Cada proyecto genoma posee una web que sirve de depositaria de los datos más recientes.

tografiar genes, identificar nuevas proteínas y genes responsables de enfermedades, junto con otras muchas iniciativas.

El resultado es un banco de datos con el potencial no sólo de impulsar rápidos avances en biología, sino también de cambiar la visión que los humanos tienen de sí mismos. Algunas de las primeras conclusiones que pueden extraerse de la secuencia del genoma humano son de gran trascendencia, mientras que otras todavía no pueden valorarse en su justa medida. No somos tan complejos como pensábamos. Los humanos no poseen 100.000 genes en aproximadamente $3{,}2 \times 10^9$ pb, según las estimaciones de hace unas pocas décadas, sino solamente de 25.000 a 30.000. Tal vez tres veces más que la mosca de la fruta (con 13.000) o dos veces más que el gusano nemátodo (18.000). Aunque los humanos han hecho su aparición hace relativamente poco tiempo, el genoma humano es muy antiguo. De las 1.278 familias de proteínas identificadas en un escrutinio inicial, sólo 94 eran exclusivas de los vertebrados. Sin embargo, aunque compartimos muchos dominios proteicos con las plantas, los gusanos y las moscas, utilizamos estos dominios en combinaciones más complejas. Formas alternativas de expresión génica (Capítulo 26) permiten obtener más de una proteína de un solo gen, proceso que los humanos y otros vertebrados utilizan con mayor frecuencia que las bacterias, los gusanos o cualquier otra forma de vida. Ello permite una mayor complejidad en las proteínas generadas a partir de nuestra dotación génica.

Sabemos ahora que solamente del 1,1% al 1,4% de nuestro DNA codifica proteínas (**Fig. 9–19**). Más del 50% de nuestro genoma consiste en secuencias cortas repetidas, la mayoría de las cuales, alrededor del 45% de la totalidad del genoma, proceden de transposones, elementos móviles cortos de DNA que son parásitos moleculares (Capítulo 25). Muchos transposones han permanecido en el mismo lugar desde hace mucho tiempo, al haber sufrido alteraciones y perdido la capacidad de moverse a nuevas localizaciones en el genoma. Otros todavía se mueven activamente a baja frecuencia, contribuyendo a que el genoma sea una entidad dinámica en continua evolución. Se conocen unos pocos transposones que han sido asimilados por el huésped y desempeñan funciones celulares útiles.

¿Qué nos dice toda esta información sobre hasta qué punto un ser humano difiere de otro? En la población humana hay millones de diferencias de una sola base, denominadas **polimorfismos de un solo nucleótido**, o **SNP.** Cada ser humano difiere de otro en aproximadamente 1 par de bases de cada 1.000. De estas pequeñas diferencias genéticas procede la diversidad humana de todos conocida: diferencias en el color del pelo, en la visión, en las alergias a los medicamentos, en la talla del pie, e incluso (en grado desconocido) en el comportamiento. Algunos SNP están asociados a determinadas poblaciones humanas y pueden suministrar información sobre migraciones que ocurrieron hace miles de años y sobre nuestro pasado evolutivo más lejano.

¿Qué nos dice toda esta información de aquello que nos hace humanos? La secuencia de nuestro pariente más cercano, el chimpancé, puede dar algunas pistas. Los genomas de los hu-

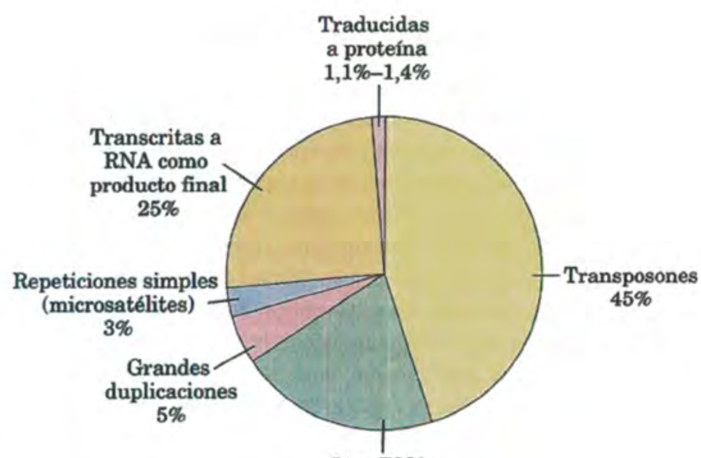


FIGURA 9–19 Tipos de secuencia en el genoma humano. El diagrama muestra las proporciones en nuestro genoma de varios tipos de secuencias.

manos y el chimpancé difieren globalmente en sólo un 1,2%, y la diferencia es menor entre las secuencias que codifican proteínas. Este valor parece pequeño, pero en estos grandes genomas se traduce en 35 millones de cambios de pares de bases, además de 5 millones de pequeñas inserciones y eliminaciones y un número sustancial de reorganizaciones genómicas de mayor entidad. Seleccionar los cambios genómicos responsables de las características exclusivamente humanas es una tarea titánica. El análisis de los genomas de los primates con el propósito de comprender la bioquímica y la evolución humanas posee un gran potencial, pero la tarea se encuentra en sus inicios.

Por muy espectaculares que parezcan estos avances, la secuenciación del genoma humano habrá sido sencilla comparada con las tareas que nos aguardan: el esfuerzo por comprender la información contenida en cada genoma. Las secuencias genómicas que son añadidas mensualmente a los bancos de datos internacionales son parecidas a mapas de carreteras, escritas en un lenguaje que en parte todavía no comprendemos. Sin embargo, son de gran utilidad para catalizar el descubrimiento de nuevas proteínas y procesos que repercuten en todos los ámbitos de la bioquímica, tal como se mostrará en los próximos capítulos.

RESUMEN 9.2 De los genes a los genomas

- La genómica consiste en el estudio de los genomas y su contenido génico.
- Los segmentos de DNA genómico pueden organizarse en genotecas –tales como las genotecas genómicas y de cDNA– que presentan una gran variedad de diseños y aplicaciones.
- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sirve para amplificar segmentos seleccionados de DNA de una genoteca o de un genoma entero.
- Como resultado de un esfuerzo internacional, los genomas de muchos organismos, incluidos los humanos, han sido secuenciados en su totalidad y están disponibles en los bancos de datos públicos.

9.3 De los genomas a los proteomas

Un gen no es simplemente una secuencia de DNA; es información que es convertida en un producto utilizable –una proteína o un RNA funcionales– siempre que éste sea necesario para la célula. El primer paso en la exploración de un genoma una vez secuenciado consiste evidentemente en catalogar los productos de los genes que contiene. Los genes que codifican RNA como producto final son más difíciles de identificar que los que codifican proteínas, e incluso estos últimos pueden ser muy difíciles de reconocer en un genoma de vertebrado. La súbita disponibilidad de gran número de secuencias ha hecho todavía más evidente que pese a los muchos años de avances de la bioquímica todavía existen miles de proteínas eucarióticas (y otras muchas en bacterias y arqueobacterias) completamente desconocidas. Estas proteínas pueden participar en procesos todavía desconocidos o bien pueden contribuir de forma inesperada en procesos que creemos entender. Además, las secuencias genómicas no dicen nada de la estructura tridimensional de las proteínas o de cómo éstas se modifican una vez sintetizadas. Las proteínas con sus múltiples funciones se han convertido en el objetivo prioritario de la bioquímica celular.

El conjunto de proteínas expresado por un genoma se denomina **proteoma,** término que hizo su aparición en la literatura científica en 1995. Este concepto rápidamente dio origen a un nuevo campo de investigación, denominado **proteómica.** El problema que afronta la proteómica es fácilmente formulable, pero de difícil solución. Cada genoma contiene millares de genes que codifican proteínas, cuyas estructuras y funciones deseamos conocer en su totalidad. Teniendo en cuenta que muchas proteínas nos sorprenden incluso después de años de estudio, la investigación de un proteoma entero es una empresa formidable. El simple descubrimiento de la función de nuevas proteínas requiere un trabajo intensivo. Los bioquímicos disponen actualmente de atajos, fruto de un amplio abanico de técnicas nuevas o puestas al día.

La función que desempeñan las proteínas puede describirse a tres niveles. La **función fenotípica** describe los efectos de una proteína sobre el organismo entero. Así, por ejemplo, la pérdida de la proteína puede redundar en un crecimiento más lento del organismo, en un patrón de desarrollo alterado o incluso la muerte. La **función celular** es una descripción del conjunto de interacciones de la proteína a nivel celular. Las interacciones con otras proteínas dentro de la célula ayudan a definir los tipos de procesos metabólicos en los que participa la proteína. Finalmente, la **función molecular** se refiere a la actividad bioquímica concreta de la proteína, incluyendo detalles tales como las reacciones catalizadas por un enzima o los ligandos unidos por un receptor.

Se está llevando a cabo un esfuerzo masivo con varios genomas, entre ellos el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el de la planta *Arabidopsis thaliana,* con objeto de inactivar cada uno de sus genes mediante ingeniería genética para investigar su efecto sobre el organismo. Si los patrones de crecimiento cambian (o si no hay crecimiento en absoluto), se obtiene información sobre la función fenotípica de la proteína producto del gen.

Hay otras tres maneras principales de investigar la función proteica: (1) comparaciones estructurales y de secuencia con genes y proteínas de función conocida, (2) determinación de dónde y cuándo se expresa un gen, y (3) investigación de las interacciones de la proteína con otras proteínas. Examinaremos sucesivamente cada uno de estos aspectos.

Muchas de las técnicas que son útiles para establecer la función de una proteína pueden aplicarse a muchas proteínas a la vez. La **biología de sistemas** estudia la multitud de cambios bioquímicos en una célula, incluidos los cambios en la población celular de proteínas en función de las presiones ambientales o genéticas. Identificaremos los temas propios de la biología de sistemas a medida que sean discutidos.

Las relaciones entre las secuencias o las estructuras suministran información sobre la función de las proteínas

La rápida acumulación de información sobre secuencias genómicas ha hecho avanzar considerablemente nuestra comprensión de la evolución (véase la Sección 3.4, p. 102). Otra razón importante para secuenciar numerosos genomas es construir un banco de datos que sirva para atribuir funciones a los genes

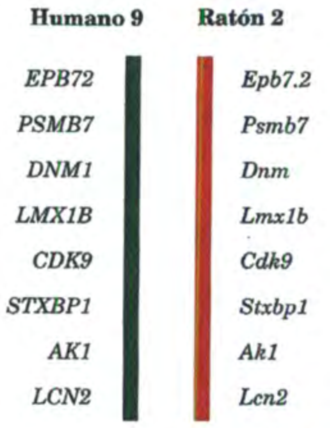


FIGURA 9–20 Sintenia en los genomas de ratón y de ser humano. Largos segmentos de los genomas de ratón y de humano tienen genes estrechamente relacionados alineados en el mismo orden en los cromosomas, una relación denominada sintenia. El diagrama muestra segmentos del cromosoma 9 humano y del cromosoma 2 de ratón. Los genes de estos segmentos poseen un elevado grado de homología y el mismo orden de los genes. Los diferentes formatos de las letras de los nombres de los genes responden a las diferentes convenciones de la nomenclatura en los dos organismos.

a partir de la comparación de los genomas, práctica conocida como **genómica comparada.** A veces, un gen recién descubierto puede ser relacionado por homología de secuencia con un gen estudiado previamente en otra o en la misma especie, y su función puede ser definida totalmente o en parte por esta relación. Los genes de diferentes especies, pero con una clara relación de secuencia y función, se denominan **ortólogos.** Los genes relacionados de forma similar entre sí, pero pertenecientes a la misma especie, se denominan **parálogos** (p. 34). Si la función de un gen se ha caracterizado en una especie, esta información puede usarse para asignar, al menos tentativamente, la función del ortólogo de una segunda especie. La identidad es más fácil de establecer cuando se comparan genomas de especies relativamente próximas, tales como el ratón y los humanos, aunque muchos genes ortólogos se han identificado en especies tan lejanas como las bacterias y los humanos. A veces, incluso el orden de los genes en el cromosoma está conservado en largos segmentos del genoma de especies próximas **(Fig. 9–20)**.

La conservación del orden de los genes, denominada **sintenia,** es un argumento adicional a favor de una relación ortóloga entre genes localizados en los mismos lugares de segmentos relacionados.

Alternativamente, ciertas secuencias asociadas con determinados motivos estructurales (Capítulo 4) pueden identificarse en las proteínas. La presencia de un motivo estructural que, por ejemplo, catalice la hidrólisis del ATP, se una al DNA o forme un complejo con átomos de zinc, puede ayudar a definir la función molecular.

Estas relaciones se establecen con ayuda de programas de ordenador cada vez más sofisticados, limitados solamente por la información disponible sobre la estructura de los genes y las proteínas y por nuestra capacidad para asociar las secuencias con los distintos motivos estructurales.

Para impulsar la atribución de funciones a partir de las relaciones estructurales se ha puesto en marcha un proyecto a gran escala de proteómica estructural. El objetivo es cristalizar y determinar la estructura de tantas proteínas y dominios estructurales como sea posible, en muchos casos con poca o ninguna información previa de la función de las proteínas. El proyecto ha sido facilitado por la automatización de algunos de los pasos más pesados de la cristalización de proteínas (véase el Recuadro 4–5). A medida que las estructuras vayan determinándose podrán consultarse en los bancos de datos estructurales descritos en el Capítulo 4. Este esfuerzo debería contribuir a establecer el grado de variación de los motivos estructurales. Cuando una proteína recién descubierta contiene plegamientos estructurales claramente relacionados con motivos de función conocida en los bancos de datos, es posible sugerir una función molecular para la proteína.

Los patrones de expresión celular pueden revelar la función celular de un gen

En todos los genomas secuenciados se han encontrado genes que codifican proteínas sin una relación estructural evidente con genes o proteínas ya conocidos. En estos casos hay que utilizar otros métodos para obtener información sobre la función génica. Averiguar en qué tejidos se expresa un gen o qué circunstancias desencadenan la aparición del producto génico puede proporcionar indicaciones muy valiosas. Se han desarrollado diversas metodologías para estudiar los diferentes patrones de expresión.

Electroforesis bidimensional en gel Tal como puede observarse en la Fig. 3–21, la electroforesis bidimensional en gel permite la separación y la visualización de hasta 1.000 proteínas diferentes en un solo gel. La espectrometría de masas (véase el Recuadro 3–2) puede utilizarse a continuación para secuenciar parcialmente las proteínas individuales y así asignar cada una de ellas a un gen. La aparición o no aparición (o desaparición) de las manchas de una proteína determinada en muestras de diferentes tejidos, de tejidos similares en diferentes etapas del desarrollo o de tejidos tratados de manera que simulen diversas situaciones biológicas puede ayudar a definir su función celular.

Dado que se muestran muchas proteínas a la vez en estos geles, la técnica también tiene aplicación en la biología de sistemas. Por ejemplo, un patógeno bacteriano puede evolucionar de manera que se convierta en resistente a uno o más antibióticos. El patrón de expresión proteica en esta cepa bacteriana cambiará con toda probabilidad quedando afectadas muchas proteínas.

Microchips de DNA Importantes avances en la tecnología de las genotecas, la PCR y la hibridación han hecho posible conjuntamente el desarrollo de los **microchips de DNA** (a veces denominados **chips de DNA**), que permiten el escrutinio rápido y simultáneo de muchos miles de genes. Trozos de DNA de genes conocidos, de unas pocas docenas a varios centenares de nucleótidos de longitud, se amplifican con PCR y se fijan sobre una superficie sólida, mediante dispositivos automáticos que depositan con precisión algunos nanolitros de una disolución de DNA. Hasta un millón de muestras son depositadas en

un casillero prediseñado que mide sólo unos pocos centímetros cuadrados. Una estrategia alternativa consiste en sintetizar el DNA directamente sobre la superficie sólida, mediante fotolitografía **(Fig. 9–21)**. Una vez confeccionado el chip puede usarse para examinar los mRNA o los cDNA de un determinado tipo celular o de un cultivo celular para identificar los genes que se expresan en esas células.

Un microchip de DNA puede servir para averiguar qué genes se expresan en un determinado estadio de desarrollo de un organismo. Se aísla el mRNA total de células en dos estadios diferentes de desarrollo y se convierte en cDNA usando transcriptasa inversa y desoxinucleótidos marcados con fluorescencia. Los cDNA fluorescentes se mezclan y se usan como sondas, que hibridarán cada una de ellas con las secuencias complementarias del microchip. En el ejemplo de la **Fig. 9–22**, los nucleótidos marcados usados para sintetizar los cDNA de cada muestra emiten fluorescencia de dos colores diferentes. Los cDNA de las dos muestras se mezclan antes de usarse como sonda con el microchip. Las manchas de fluorescencia verde representan los mRNA más abundantes en la fase de una sola célula; las de fluorescencia roja representan mRNA más abundantes en fases posteriores del desarrollo. Los mRNA igualmente abundantes en ambos estadios de desarrollo dan fluorescencia amarilla. El uso de una mezcla de dos muestras para medir la abundancia relativa de las secuencias en lugar de la abundancia absoluta corrige las diferencias en las cantidades de DNA depositadas originalmente en cada punto del casillero y otras inconsistencias que puedan existir entre los diferentes puntos del microchip. Los puntos que emiten fluorescencia representan una instantánea de todos los genes que son expresa-

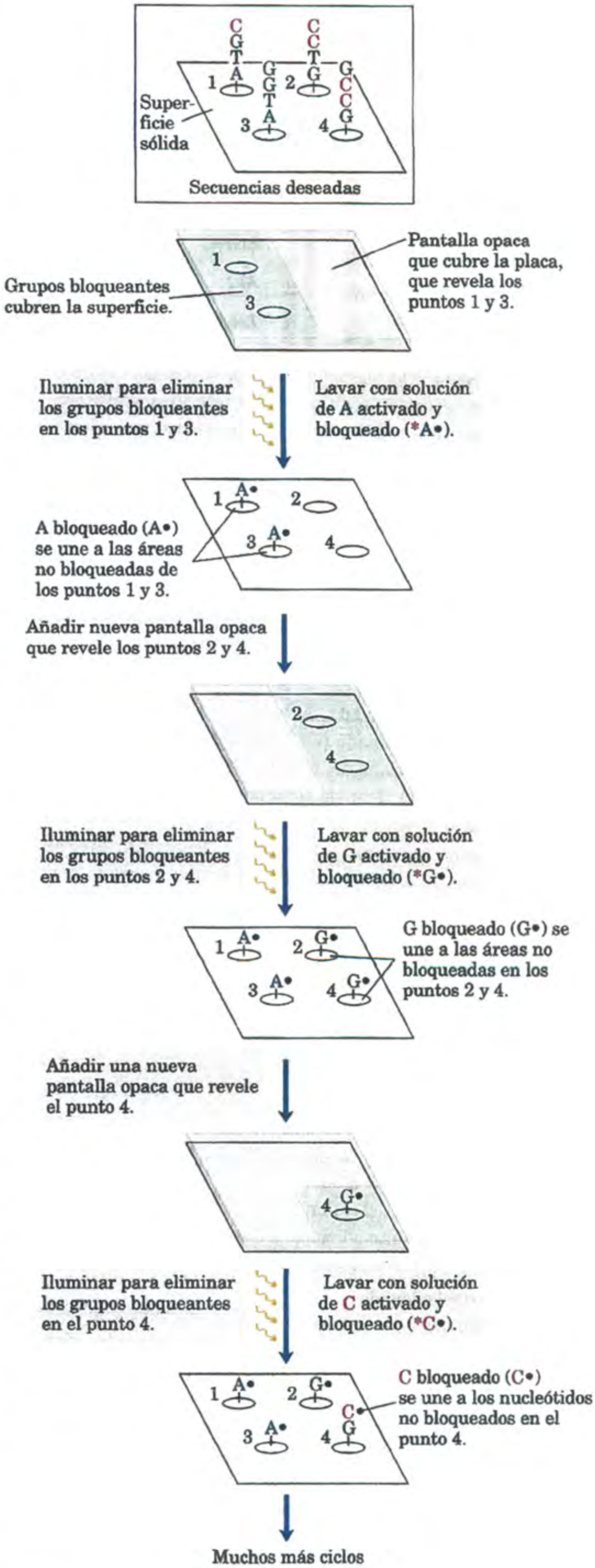


FIGURA 9–21 Fotolitografía. Esta técnica para preparar un microchip de DNA utiliza precursores nucleotídicos que son activados por la luz; cada nucleótido se une al siguiente mediante una fotorreacción (al contrario del proceso químico ilustrado en la Fig. 8–35). La síntesis de la secuencia oligonucleotídica en cada punto de una superficie sólida es dirigida por un ordenador. Los grupos reactivos en tal superficie se encuentran inicialmente inactivados mediante grupos de bloqueo fotoactivables (•). Una pantalla que cubre la superficie se abre sobre las áreas programadas para recibir un nucleótido determinado y un flash de luz elimina el grupo de bloqueo en las áreas descubiertas. La superficie es lavada sucesivamente con disoluciones que contienen un tipo de nucleótido activado (p. ej., *A•) para reaccionar con el grupo 3'-hidroxilo (*). Un grupo de bloqueo en el grupo 5'-hidroxilo del nucleótido evita reacciones no deseadas y el nucleótido queda unido a la superficie en los puntos iluminados a través del grupo 3'-hidroxilo. La pantalla es reemplazada por otra que ilumina selectivamente los puntos programados para recibir una G; la luz elimina los grupos de bloqueo en 5' de los nucleótidos unidos anteriormente y a continuación se añade *G• para unir G a estos puntos. La superficie se lava sucesivamente con disoluciones que contienen cada uno de los tipos restantes de nucleótido activado (*C•, *T•), utilizando pantallas e iluminación específicos para asegurar que se añaden los nucleótidos correctos y con la secuencia correcta en cada punto. El proceso continúa hasta finalizar las secuencias deseadas en cada punto de la superficie. En cada punto se generan muchas cadenas con la misma secuencia, no sólo una como se muestra en la Figura. Las superficies poseen millares de puntos con secuencias distintas (véase la Fig. 9–22); este microchip contiene sólo cuatro puntos para ilustrar la metodología.

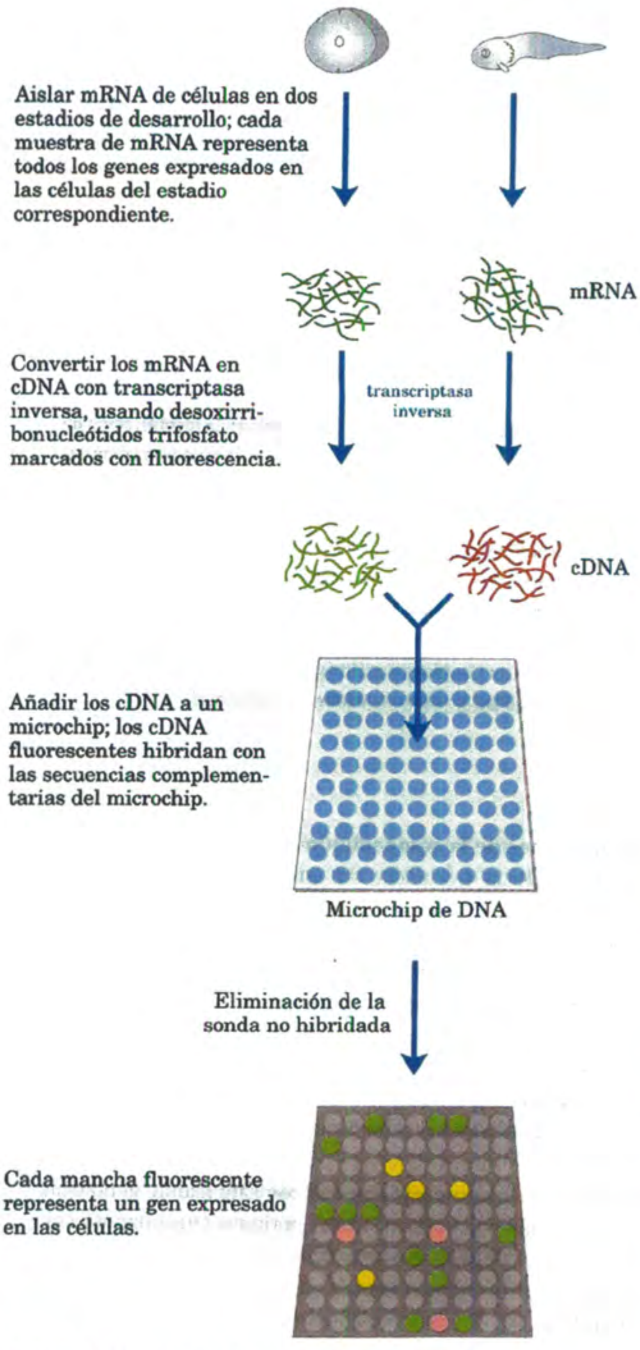


FIGURA 9–22 Microchip de DNA. Cualquier secuencia de DNA conocida, de cualquier procedencia, puede usarse en un microchip. El DNA puede obtenerse por síntesis química o por PCR. El DNA es depositado sobre una superficie sólida (normalmente láminas de vidrio tratadas especialmente) con la ayuda de dispositivos automáticos capaces de depositar gotas muy pequeñas (nanolitros) en posiciones definidas. El DNA es anclado a las láminas de vidrio mediante luz UV. Una vez el DNA está unido a la superficie puede ser examinado con otros ácidos nucleicos fluorescentes. En este ejemplo, las muestras de mRNA son obtenidas de células de dos estadios diferentes del desarrollo de la rana. Las sondas de cDNA de cada una de las muestras se preparan con nucleótidos que emiten fluorescencia de diferentes colores para cada muestra; para el escrutinio del microchip se usa una mezcla de los cDNA. Las manchas que emiten fluorescencia verde representan mRNA más abundantes en el estadio de una sola célula, mientras que las manchas que emiten fluorescencia roja representan secuencias más abundantes en estadios más avanzados del desarrollo. Las manchas amarillas indican aproximadamente la misma cantidad en ambos estadios. **Construcción de un chip de oligonucleótidos**

dos en las células en el momento en que fueron recogidas y proporcionan una visión de la expresión génica a escala de la totalidad del genoma. En un gen de función desconocida, el momento y las circunstancias de su expresión pueden proporcionar pistas importantes acerca de su papel en la célula.

En la **Fig. 9–23** se muestra un ejemplo espectacular de las posibilidades de esta técnica. Fragmentos de cada uno de los 6.000 genes del genoma completamente secuenciado de levadura se amplificaron separadamente por PCR y cada uno se depositó en una posición determinada para confeccionar el microchip. Por así decirlo, este microchip representa una instantánea del genoma entero de levadura.

Los microchips son muy útiles en la biología de sistemas, pues permiten examinar los cambios de expresión génica a escala celular. El objeto de estudio puede ser un solo gen o el genoma completo. Se puede usar la misma tecnología para examinar cambios del DNA, tales como los cambios genéticos introducidos por la selección natural o por la simple variación de la población. Si una población bacteriana muestra un nuevo fenotipo que indica la presencia de una o más mutaciones, éstas pueden identificarse rápidamente mediante microchips. Un microchip que contenga la información de las secuencias del tipo salvaje se hibrida con DNA de las células mutantes. La hibridación disminuirá siempre que el DNA de las células mutantes y el

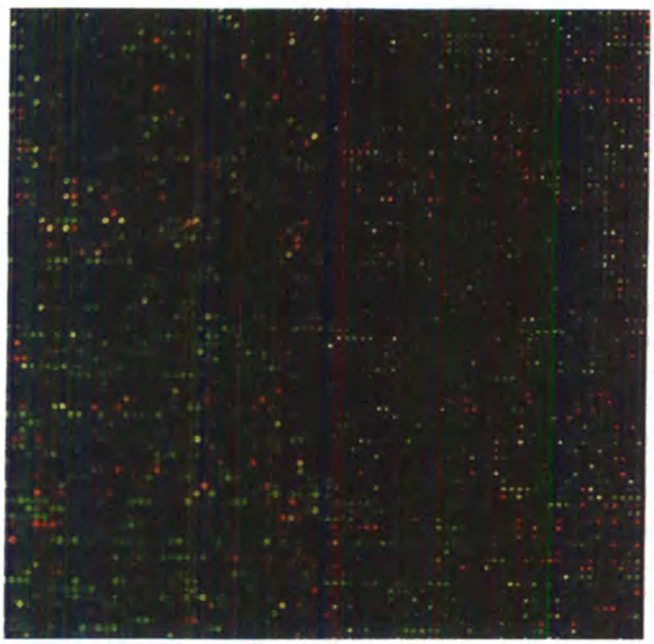


FIGURA 9–23 Imagen ampliada de un microchip de DNA. Cada mancha coloreada de este microchip contiene DNA de uno de los 6.200 genes del genoma de levadura (*S. cerevisiae*), todos los cuales están representados en el chip. El microchip ha sido examinado con un ácido nucleico marcado con fluorescencia derivado del mRNA obtenido de (1) células en cultivo en crecimiento normal y (2) cinco horas después de que las células empezaran a formar esporas. Las manchas verdes corresponden a genes expresados con mayor intensidad durante el crecimiento normal, y las manchas rojas a genes expresados con mayor intensidad durante la esporulación. Las manchas amarillas corresponden a genes cuyo nivel de expresión no cambia durante la esporulación. Esta imagen está ampliada; el microchip realmente sólo mide 1,8 × 1,8 cm. **Escrutinio de patrones de expresión con un microchip de oligonucleótidos**

DNA de tipo salvaje no coincidan, generándose una señal en los puntos correspondientes. La secuenciación más detallada puede mostrar posteriormente los cambios exactos y la región genómica implicada. Con esta tecnología se pueden abordar problemas de interés médico, tales como el desarrollo de nuevas cepas víricas y la evolución de la resistencia a antibióticos en patógenos bacterianos.

Los microchips ya tienen un importante papel en el tratamiento del cáncer. Hay muchos tipos diferentes de cáncer humano y los tumores, incluso en un tejido concreto, pueden variar ampliamente en velocidad de crecimiento, tendencia a la metástasis y respuesta a diversas terapias. A menudo es imposible identificar los tipos de tumores exclusivamente por su apariencia. Sin embargo, las células que forman un tumor poseen patrones característicos de expresión génica, conocidos como perfiles transcripcionales, que a menudo difieren ampliamente de un tumor a otro. Éstos pueden suministrar una especie de huella digital que identifica el tumor. Los progresos recientes en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama son un buen ejemplo. Durante la última década, numerosos estudios clínicos han establecido los perfiles transcripcionales de millares de casos de cáncer de mama mediante microchips. Se ha realizado un seguimiento de los protocolos de tratamiento y los éxitos y los fracasos se han documentado cuidadosamente. Gradualmente se han podido identificar genes y grupos de genes que cuando se expresan a niveles más altos y en determinadas combinaciones poseen valor predictivo. El resultado consiste en una base de datos cada vez más amplia que permite la aplicación de los perfiles transcripcionales a la prognosis y la selección de las terapias más eficaces. Estas técnicas se utilizan cada vez más ampliamente en clínica oncológica, y su valor para oncólogos y pacientes no dejará de crecer con el tiempo y la experiencia. ■

Chips de proteína Las proteínas también pueden inmovilizarse sobre una superficie sólida y usarse para detectar la presencia o ausencia de otras proteínas en una muestra. Por ejemplo, se puede preparar un chip de anticuerpos frente a determinadas proteínas, inmovilizándolos individualmente sobre una superficie sólida. Se añade una muestra de proteínas y si ésta contiene una proteína que se una a cualquiera de los anticuerpos es posible detectarla por una modalidad de ELISA en estado sólido (véase la Fig. 5–26b). Se están desarrollando muchos otros tipos y aplicaciones de los chips de proteínas. Muchas otras aplicaciones de los chips de proteínas están siendo desarrolladas. Esta tecnología puede aplicarse también a una sola proteína o a todas las proteínas de un sistema biológico.

La detección de las interacciones proteína-proteína es útil en el esclarecimiento de las funciones celulares y moleculares

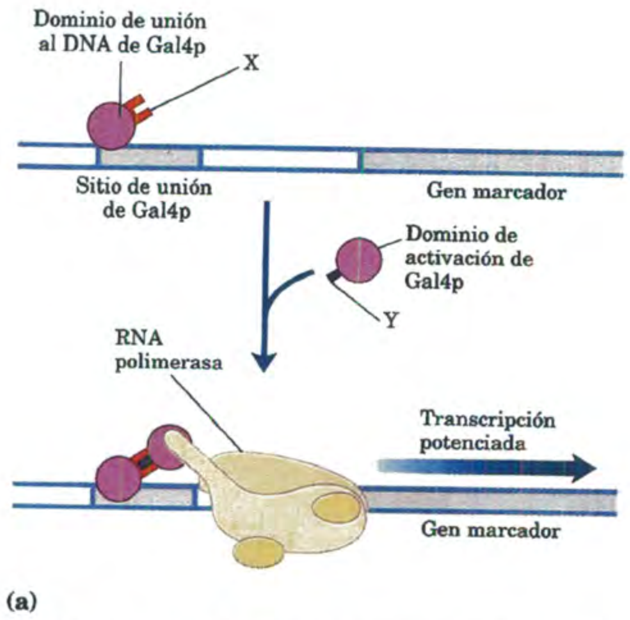
La determinación de las interacciones de una proteína es clave para definir sus funciones. En el caso de las interacciones proteína-proteína, la asociación de una proteína de función desconocida con otra de función conocida puede sugerir por asociación cuál pueda ser la función desconocida. Las técnicas utilizadas en estas investigaciones son muy variadas.

	Especie			
Proteína	1	2	3	4
P1	+	–	+	+
P2	–	–	+	–
P3	+	+	–	+
P4	+	–	+	–
P5	+	–	–	–
P6	+	+	–	+
P7	+	+	+	–

FIGURA 9–24 Aplicación de la genómica comparada en la identificación de genes relacionados funcionalmente. Uno de los usos de la genómica comparada consiste en obtener perfiles filogenéticos para identificar genes que siempre aparezcan juntos en el genoma. Este ejemplo muestra una comparación de genes de cuatro organismos, pero en la práctica las búsquedas por ordenador pueden examinar docenas de especies. La denominación P1, P2, etc. se refiere a las proteínas codificadas en cada especie. Esta técnica no requiere que las proteínas sean homólogas. En este ejemplo, puesto que las proteínas P3 y P6 siempre se encuentran juntas, es posible que estén funcionalmente relacionadas. Para confirmar esta posibilidad se requeriría información adicional.

Comparaciones de la composición de los genomas Aunque no se trate de la evidencia de una asociación directa, la mera presencia de combinaciones de genes en genomas determinados puede sugerir la función proteica. Se puede simplemente buscar un gen en los bancos de datos genómicos y ver que otros genes se encuentran presentes en los mismos genomas **(Fig. 9–24)**. Cuando dos genes aparecen siempre juntos en un genoma es posible que las proteínas por ellos codificadas estén funcionalmente relacionadas. Estas correlaciones son más útiles si se conoce la función de al menos una de las proteínas.

Purificación de complejos proteicos Empleando genotecas de cDNA en las que los genes son contiguos (fusionados) con un epítopo de identificación, es posible inmunoprecipitar el producto proteico de un gen usando el anticuerpo que se une al epítopo (Fig. 9–15b). Si la proteína marcada se expresa en las células, otras proteínas pueden precipitar junto con ella. La identificación de las proteínas asociadas puede poner de manifiesto algunas de las interacciones proteína-proteína de la proteína marcada. Hay muchas variantes de este procedimiento. Por ejemplo, un extracto crudo de células que expresan una proteína marcada se añade a una columna que contiene el anticuerpo inmovilizado. La proteína marcada se une al anticuerpo y las proteínas que interaccionan con ella a veces también son retenidas por la columna. La conexión entre la proteína y el identificador se corta con una proteasa específica y los complejos proteicos son eluídos y analizados. Estos métodos pueden utilizarse para estudiar las complejas redes de interacciones en una célula. Muchas de las etiquetas terminales mostradas en la Tabla 9–3 pueden usarse en protocolos cromatográficos similares, que aprovechan la afinidad de una etiqueta por un ligando determinado para identificar las proteínas que se unen a una determinada proteína etiquetada.



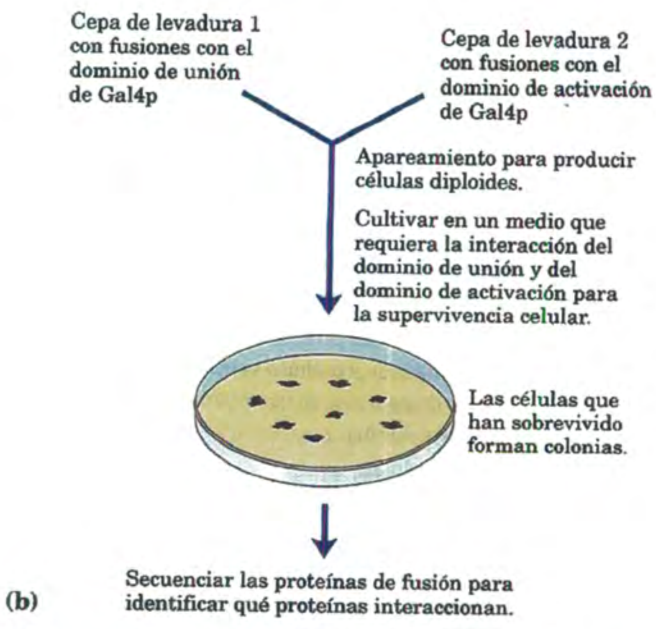


FIGURA 9–25 El sistema del doble híbrido en levadura. (a) Este sistema para detectar interacciones proteína-proteína se basa en aproximar el dominio de unión al DNA y el dominio de activación de la proteína Gal4 de levadura a través de la interacción de dos proteínas, X e Y, con las cuales está fusionado cada dominio. Esta interacción está acompañada de la expresión de un gen marcador. **(b)** Las dos fusiones se localizan en cepas separadas de levadura, que después son apareadas. La mezcla apareada se cultiva en un medio que no permita la subsistencia de la levadura a menos que se exprese el gen marcador. Por lo tanto, todas las colonias supervivientes contienen parejas de proteínas que interaccionan. La secuenciación de las proteínas de fusión en las células supervivientes revela qué proteínas interaccionan. **Sistemas del doble híbrido en levadura**

Análisis del doble híbrido en levadura Un elaborado método genético para definir interacciones proteína-proteína se basa en las propiedades de la proteína Gal4 (Gal4p), que activa la transcripción de ciertos genes de levadura (véase la Fig. 28–31).

Gal4p tiene dos dominios, uno que se une a una secuencia de DNA específica y otro que activa la RNA polimerasa que sintetiza mRNA de un gen marcador adyacente. Los dominios son estables por separado, pero la activación de la RNA polimerasa requiere la interacción con el dominio de activación, que a su vez requiere un correcto posicionamiento a cargo del dominio de unión al DNA. Por lo tanto, los dominios deben estar juntos para funcionar correctamente **(Fig. 9–25a)**.

En este método, las regiones que codifican proteína de los genes analizados se ligan con la región codificante del dominio de unión al DNA o con el dominio de activación de Gal4p, de forma que los genes resultantes expresan las correspondientes proteínas de fusión. Si una proteína unida al dominio de unión al DNA interacciona con una proteína unida al dominio de activación, se activa la transcripción. El gen marcador transcrito como resultado de la activación generalmente codifica una proteína necesaria para el crecimiento o es un enzima que cataliza una reacción con un producto coloreado. Por lo tanto, las células, cultivadas en un medio apropiado, que contienen la pareja de proteínas que interaccionan se distinguen fácilmente de aquellas que no la contienen. Habitualmente muchos genes de una cepa de levadura se ligan con el dominio de unión al DNA de Gal4p y muchos otros genes se ligan al dominio de activación de Gal4p en otra cepa de levadura. A continuación, las cepas de levadura se aparean y las células diploides individuales se cultivan hasta obtener colonias (Fig. 9–25b). Este procedimiento permite el escrutinio a gran escala de proteínas que interaccionan en la célula.

Todas estas técnicas suministran valiosa información sobre la función de las proteínas. Sin embargo, no pueden reemplazar a la bioquímica clásica. Simplemente, hacen posible una rápida incursión en nuevos problemas biológicos importantes; pero, finalmente, la comprensión detallada de la función de una nueva proteína requiere análisis bioquímicos tradicionales, tales como los utilizados en el estudio de muchas de las proteínas descritas en este texto. En combinación con las nuevas técnicas de bioquímica y biología molecular en rápida evolución, la genómica y la proteómica están acelerando no sólo el descubrimiento de nuevas proteínas sino también de nuevos procesos y mecanismos biológicos.

RESUMEN 9.3 De los genomas a los proteomas

- El proteoma es el conjunto de proteínas producido por el genoma de una célula. El nuevo campo de la proteómica pretende catalogar y determinar las funciones de todas las proteínas de una célula. La investigación integrada de la multiplicidad de proteínas o de otras macromoléculas de una célula en ocasiones se denomina biología de sistemas.
- Una de las maneras más efectivas de determinar la función de un nuevo gen es mediante la genómica comparada; es decir, la búsqueda en los bancos de datos de proteínas con

secuencias similares. Parálogos y ortólogos son genes (y sus proteínas) con funciones y secuencias claramente relacionadas pertenecientes a la misma o a diferentes especies. En ocasiones, la presencia sistemática de un gen junto a otros en varios genomas puede sugerir una posible función.

- Los proteomas celulares pueden ser visualizados con ayuda de la electroforesis bidimensional y estudiados por espectrometría de masas.
- La función celular de una proteína a veces puede deducirse del estudio de dónde y cuándo se expresa su gen. Los chips de DNA y de proteína se usan para estudiar la expresión génica a nivel celular.
- Varias técnicas, entre las que se encuentran la genómica comparada, la inmunoprecipitación y el análisis de los híbridos dobles en levadura, sirven para identificar las interacciones proteína–proteína. Estas interacciones son muy útiles en el estudio de la función proteica.

9.4 Alteraciones del genoma y nuevos productos biotecnológicos

No hace falta remitirse a un futuro lejano para encontrar aplicaciones prácticas para las nuevas biotecnologías y oportunidades para nuevos descubrimientos en investigación básica. Ésas son las promesas y retos de la genómica. No sólo somos capaces de *entender* los genomas, podemos *cambiarlos*. Ésta es, probablemente, la aportación fundamental de las nuevas tecnologías. A medida que mejoremos nuestra capacidad de modificar organismos y producir nuevos fármacos aumentarán las posibilidades de mejorar la nutrición y la salud humanas. Estas posibilidades se materializarán solamente si se toman las precauciones oportunas para asegurar el uso responsable de estas técnicas.

Un parásito bacteriano facilita la clonación en plantas

La introducción de DNA recombinante en plantas tiene enormes posibilidades en agricultura. Puede contribuir a mejorar las propiedades nutritivas y el rendimiento de las cosechas o su resistencia al estrés ambiental, causado por plagas de insectos, enfermedades, frío, salinidad y sequía. En algunas especies, es posible obtener plantas fértiles a partir de una única célula transformada, de manera que un gen introducido puede transmitirse a la descendencia a través de las semillas.

Todavía no se han encontrado plásmidos naturales en plantas que pudieran facilitar la clonación en plantas, por lo que la principal dificultad técnica es la introducción del DNA en las células vegetales. Un importante y versátil aliado en esta tarea es la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria puede invadir la planta a través de las heridas, transformando las células cercanas, que forman un tumor llamado agalla. *Agrobacterium* contiene un gran plásmido (200.000 pb), denominado **plásmido Ti (Fig. 9–26a)**. Cuando la bacteria entra en contacto con una célula vegetal dañada, un fragmento de

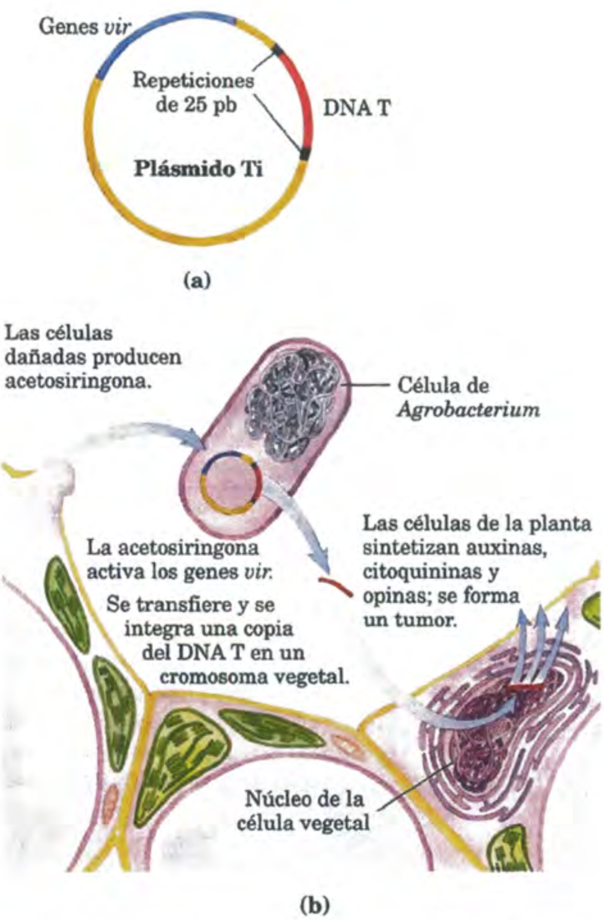


FIGURA 9–26 Una bacteria parásita de las plantas transfiere DNA al interior de las células vegetales. (a) El plásmido Ti (inductor de tumores) de *Agrobacterium tumefaciens*. **(b)** Las células dañadas de las plantas producen y liberan el compuesto fenólico acetosiringona. Cuando *Agrobacterium* detecta este compuesto se inducen los genes de virulencia (*vir*) del plásmido Ti. Los genes *vir* codifican los enzimas necesarios para introducir el segmento de DNA T del plásmido Ti en el genoma de las células vegetales vecinas. Se sintetiza una copia monocadena del DNA T y se transfiere a la célula de la planta, donde se convierte en DNA dúplex que se integra en el cromosoma de la célula vegetal. El DNA T codifica enzimas que sintetizan tanto hormonas de crecimiento como también opinas (véase la Fig. 9–27); estas últimas sólo son metabolizadas por *Agrobacterium* (que los usa como nutriente). La expresión de los genes T en las células vegetales transformadas da lugar a un crecimiento celular aberrante (formación de un tumor) y a la desviación de los nutrientes de las células de la planta hacia las bacterias invasoras.

23.000 pares de bases del plásmido Ti, denominado DNA T, se transfiere desde el plásmido y se integra en una posición al azar en uno de los cromosomas de la célula vegetal (Fig. 9–26b). La transferencia del DNA T de *Agrobacterium* al cromosoma de la célula vegetal depende de dos repeticiones de 25 pb que flanquean el DNA T y de los productos de los genes de la virulencia (*vir*) del plásmido Ti (Fig. 9–26a).

El DNA T codifica enzimas que convierten metabolitos de la planta en dos clases de compuestos beneficiosos para la bacteria **(Fig. 9–27)**. El primer grupo consiste en hormonas de crecimiento vegetales (auxinas y citoquininas), que estimulan el crecimiento de las células de la planta transformadas que forman el tumor de agalla. El segundo grupo genera una serie de aminoácidos poco frecuentes llamados opinas, que sirven de

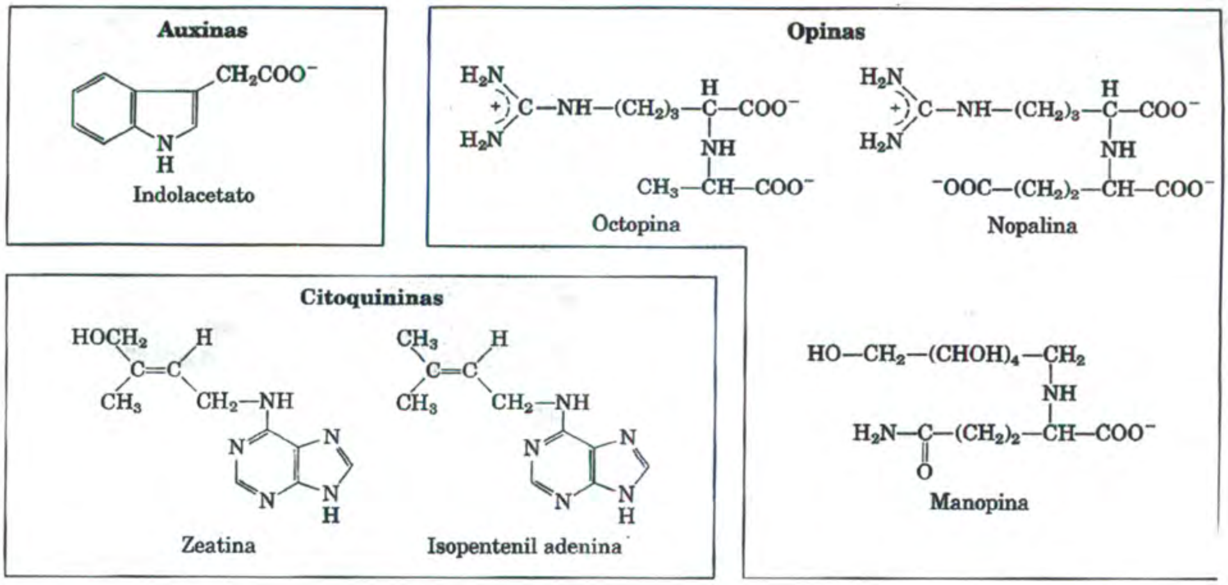


FIGURA 9–27 Metabolitos producidos en las células de una planta infectada por *Agrobacterium*. Las auxinas y las citoquininas son hormonas de crecimiento de los vegetales. La auxina más común es el indolacetato, un derivado del triptófano. Las citoquininas son derivados de la adenina. Las opinas suelen proceder de precursores de aminoácidos; al menos 14 opinas diferentes son producidas por enzimas codificados por plásmidos Ti de diferentes especies de *Agrobacterium*.

nutrientes de la bacteria. Las opinas se producen en grandes cantidades en las células tumorales, que las segregan al entorno, donde sólo pueden ser metabolizadas por *Agrobacterium*, mediante enzimas codificados en otras regiones del plásmido Ti. De este modo, la bacteria desvía recursos de la planta, convirtiéndolos en formas que sólo ella puede aprovechar.

Éste es un ejemplo poco frecuente de transferencia de DNA de una bacteria a una célula eucariótica, mediante un proceso de ingeniería genética natural, que puede ser aprovechado para transferir DNA recombinante (en lugar del DNA T) al genoma de la planta. Una estrategia común de clonación utiliza un *Agrobacterium* que contiene dos plásmidos recombinantes diferentes. El primero es un plásmido Ti, del cual se ha eliminado el DNA T en el laboratorio **(Fig. 9–28a)**. El segundo es un vector lanzadera *Agrobacterium-E. coli*, en el cual las repeticio-

FIGURA 9–28 Estrategia del doble plásmido para crear una planta recombinante. **(a)** Uno de los plásmidos es un plásmido Ti modificado que contiene los genes *vir*, pero carece de DNA T. **(b)** El otro plásmido contiene un fragmento de DNA con el gen foráneo (p. ej., el gen de la proteína insecticida, descrito en la Fig. 9–30) y un elemento de resistencia a un antibiótico (en este caso, resistencia a la kanamicina), flanqueado por las repeticiones de 25 pares de bases del DNA T, requeridas para la transferencia de los genes del plásmido al cromosoma de la planta. El segundo plásmido también contiene el origen de replicación necesario para su propagación en *Agrobacterium*.

Cuando la bacteria penetra a través de las heridas (borde de la hoja cortada), los genes *vir* del primer plásmido hacen posible la transferencia del segmento del segundo plásmido flanqueado por las dos repeticiones de 25 pares de bases al genoma de la planta. Se generan nuevas plantas cuando se coloca la hoja con las células transformadas en una placa de agar que contiene kanamicina y concentraciones adecuadas de hormonas de crecimiento. Las células no transformadas mueren por acción de la kanamicina. El gen foráneo y el elemento de resistencia al antibiótico se suelen transferir juntos; por tanto, las plantas que crecen en presencia de este antibiótico contienen generalmente el gen foráneo.

nes de 25 pares de bases del DNA T flanquean el gen foráneo que se quiere introducir en la célula vegetal, junto con un marcador seleccionable, tal como la resistencia al antibiótico kanamicina (Fig. 9–28b). El *Agrobacterium* así modificado se usa para infectar una hoja, pero las agallas no se forman porque los genes del DNA T correspondiente a los enzimas para la biosíntesis de auxina, citoquinina y opinas no se encuentran en ninguno de los plásmidos. En su lugar, los productos de los genes *vir* del plásmido Ti modificado causan la transformación de las células de la planta por el gen flanqueado por las repeticiones de 25 pares de bases del segundo plásmido. Las células vegetales transformadas se pueden seleccionar por crecimiento en placas de agar en presencia de kanamicina e inducirse con hormonas de crecimiento para formar nuevas plantas que contengan el gen foráneo en todas sus células.

La transferencia de DNA recombinante a las plantas se puede ilustrar admirablemente con un experimento consistente en introducir el gen de la luciferasa de luciérnaga en las células de una planta de tabaco **(Fig. 9–29)**, que se usa con frecuencia porque sus células son fáciles de transformar con *Agrobacterium*. Las posibilidades de esta tecnología no se limitan a la obtención de plantas que brillan en la oscuridad. Se han usado los mismos métodos para producir plantas resistentes a herbicidas, virus y plagas de insectos **(Fig. 9–30)**. Entre los beneficios potenciales se encuentran mejores rendimientos y la reducción de las necesidades de compuestos químicos perjudiciales para el ambiente.

La biotecnología puede introducir nuevos caracteres en las plantas mucho más rápidamente que los métodos tradicionales de cruzamiento. Un ejemplo destacable es el desarrollo de sojas resistentes al herbicida de uso común glifosato (el principio activo del RoundUp). El glifosato se destruye más rápidamente en el medio que la mayoría de herbicidas (plantas sensibles al glifosato pueden plantarse en un área tratada al cabo de tan sólo 48 horas), y su uso generalmente no resulta en la contaminación de las aguas subterráneas ni se propaga de un año para otro. Un campo plantado con sojas resistentes a glifosato puede ser tratado una vez durante la estación de crecimiento estival para eliminar todas las malas hierbas sin afectar la soja **(Fig. 9–31)**. Los potenciales efectos negativos de esta tecnología, tales como la aparición de malas hierbas resistentes al glifosato o la difusión de plantas recombinantes difíciles de controlar, son motivo de preocupación para los investigadores y para el público en general.

FIGURA 9–29 Planta de tabaco que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga. La luz se produjo después de que la planta fuese regada con una disolución de luciferina, sustrato de este enzima productor de luz (véase el Recuadro 13–1). Sin embargo, no hay que esperar que pronto dispongamos en las floristerías de plantas ornamentales que brillen en la oscuridad, ya que la luz que producen es muy débil; esta fotografía requirió una exposición de 24 horas. El auténtico interés de este experimento es mostrar que es posible introducir nuevos caracteres en las plantas.

FIGURA 9–30 Plantas de tomate manipuladas genéticamente para ser resistentes a larvas de insectos. Dos plantas de tomate fueron expuestas a un número igual de larvas de polilla. La planta de la izquierda no fue alterada genéticamente. La planta de la derecha expresa el gen de una toxina proteica, derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Esta proteína, introducida con un protocolo similar al descrito en la Figura 9–28, es tóxica para las larvas de algunas especies de polilla, mientras que es inocua para los humanos y otros organismos. La resistencia a los insectos también ha sido introducida genéticamente en el algodón y en otras plantas.

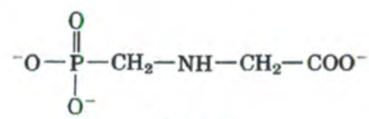
La manipulación de los genomas animales suministra información sobre la estructura de los cromosomas y la expresión génica

La transformación de células animales con material genético foráneo es una técnica importante para el avance del conocimiento de la estructura y la función de los genomas animales, así como para la creación de animales con caracteres nuevos. Estas posibilidades han estimulado el desarrollo de métodos cada vez más sofisticados para la clonación de animales.

La mayor parte de estas técnicas necesitan una fuente de células donde introducir el DNA. Aunque los tejidos intactos son difíciles de mantener y manipular in vitro, muchos tipos de células animales se pueden aislar y cultivar en el laboratorio si se satisfacen rigurosamente los requerimientos para su crecimiento. Las células procedentes de un determinado tejido, mantenidas en condiciones adecuadas de **cultivo de tejidos,** pueden conservar el estado diferenciado (por ejemplo, una célula hepática mantenerse como tal) durante semanas o incluso meses.

(a)

(b)



Glifosato

FIGURA 9–31 Plantas de soja resistentes al glifosato. Las fotografías muestran dos zonas de un campo de soja de Wisconsin. **(a)** Sin tratamiento con glifosato esta parte del campo de soja está ocupado por las malas hierbas. **(b)** Las plantas de soja resistentes al glifosato progresan en esta parte del campo tratada con glifosato. El glifosato se degrada rápidamente en el medio. El uso agrícola de plantas modificadas genéticamente progresa en medio de muchas precauciones, para equilibrar las extraordinarias posibilidades de esta tecnología con la exigencia de seleccionar los nuevos caracteres con prudencia. Tanto la ciencia como la sociedad tienen el mayor interés en asegurar que el uso de plantas recombinantes no tenga efectos adversos sobre el medio ambiente o la salud humana.

No se dispone de vectores similares a los plásmidos para introducir DNA en células animales, por lo que la transformación normalmente requiere la integración del DNA en un cromosoma de la célula huésped. La introducción eficiente del DNA en el núcleo celular y su integración en un cromosoma sin afectar ningún gen esencial siguen siendo los problemas técnicos principales de la ingeniería genética de las células animales.

Los métodos disponibles para introducir DNA en las células animales difieren en eficiencia y comodidad. La captación espontánea de DNA o la electroporación, métodos comparables con los comúnmente utilizados en la transformación de bacterias, han dado resultados moderadamente satisfactorios. Sin embargo, son métodos poco eficientes, pues sólo alcanzan a transformar una de cada 100 a 10.000 células. La **microinyección** consiste en la inyección directa del DNA en el núcleo de una célula con ayuda de una aguja muy fina. En manos expertas, este método tiene una alta proporción de éxitos, pero el número total de células que puede ser tratado es pequeño, porque cada célula ha de inyectarse individualmente.

Los métodos más eficaces y más ampliamente usados para transformar células animales se basan en el uso de liposomas o vectores víricos. Los liposomas son pequeñas vesículas formadas por una bicapa lipídica que encierra un compartimiento acuoso (véase la Fig. 11–4). Es posible fusionar liposomas que contengan una molécula de DNA recombinante con las membranas de células diana para así introducir el DNA en las células. El DNA a veces llega hasta el núcleo, donde puede integrarse en uno de los cromosomas (normalmente en posiciones al azar). Los **vectores víricos** son incluso más eficaces en la introducción del DNA. Los virus animales han desarrollado mecanismos eficaces para introducir sus ácidos nucleicos en las células, y algunos también poseen mecanismos para insertar su DNA en los cromosomas de las células huésped. Algunos retrovirus (véase la Fig. 26–33) y adenovirus han sido modificados para actuar como vectores víricos para introducir DNA foráneo en células de mamífero.

El trabajo con retrovirus es ilustrativo de algunas de las estrategias que se están utilizando **(Fig. 9–32)**. Cuando un retrovirus modificado entra en la célula, su genoma de RNA es convertido en DNA por la transcriptasa inversa y, a continuación, es integrado en el genoma del huésped por la integrasa viral. Para que este proceso tenga lugar se requieren regiones de DNA especializadas: las repeticiones terminales largas (LTR) son necesarias para la integración del DNA retrovírico en el cromosoma huésped y la secuencia ψ (psi) es necesaria para empaquetar el RNA viral en partículas víricas (véase la Fig. 26–34).

Los genes *gag*, *pol* y *env* del genoma retrovírico, necesarios para la replicación y el ensamblaje de las partículas víricas, pueden ser reemplazados por DNA foráneo. Para el ensamblaje de virus que contengan la información genética recombinante, el DNA se ha de introducir en las células en cultivo junto con un "virus colaborador", que contenga los genes para producir partículas víricas, pero que carezca de la secuencia ψ, necesaria para el empaquetamiento. Ello permite la transcripción del DNA recombinante y que su RNA se empaquete en partículas víricas. Estas partículas pueden actuar como vectores para introducir el RNA recombinante en células diana. Los enzimas transcriptasa inversa e integrasa víricos (producidos por el virus colaborador) también se empaquetan en la partícula viral y se introducen en las células diana. Una vez el genoma vírico recombinante se ha introducido en el interior de la célula, estos enzimas fabrican una copia de DNA a partir del RNA vírico, que se integra en un cromosoma de la célula huésped. El DNA recombinante integrado se convierte en una parte estable del cromosoma de la célula diana y se replica con el cromosoma en cada división celular. La propia célula no es puesta en peligro por el DNA vírico integrado porque el virus recombinante carece de los genes necesarios para producir copias de RNA de su genoma y para empaquetarlas en nuevas partículas víricas. Los retrovirus recombinantes son a menudo el mejor vehículo para introducir DNA en un número elevado de células de mamífero.

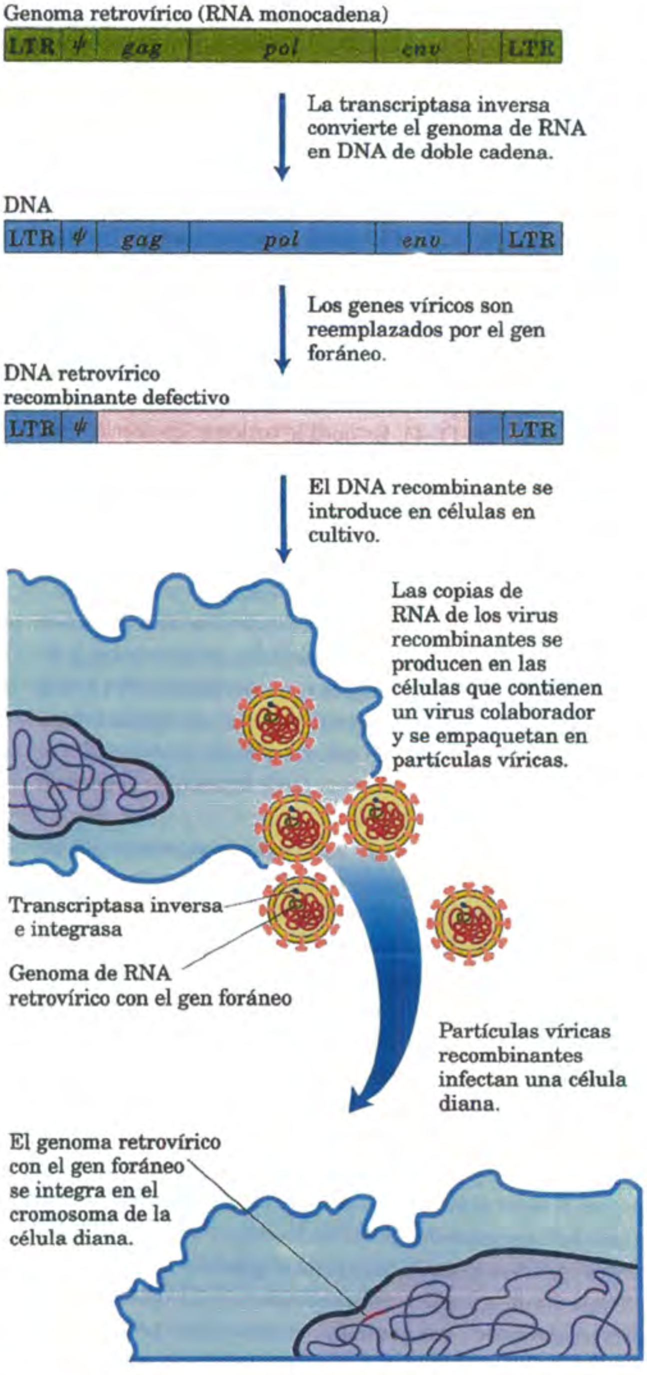


FIGURA 9–32 Clonación en células de mamífero con vectores retrovíricos. El genoma del retrovirus (aquí mostrado de forma simplificada), una vez modificado para que transporte el gen foráneo (rosa), es añadido al cultivo de células huésped. El virus colaborador (no mostrado) carece de la secuencia de empaquetamiento, ψ, por lo que sus transcritos de RNA no pueden ser empaquetados en partículas víricas. Sin embargo, suministra los productos de los genes *gag*, *pol* y *env*, necesarios para el empaquetamiento del retrovirus modificado en partículas víricas funcionales, que harán posible que el gen foráneo en el genoma del virus recombinante se introduzca eficientemente en las células receptoras.

Cada tipo de virus tiene diferentes propiedades, por lo que se están modificando diferentes clases de virus animales para que sirvan de vectores para transformar células de mamífero. Por ejemplo, los adenovirus carecen de un mecanismo que permita su integración en un cromosoma. El DNA recombinante introducido por un vector adenovírico es, pues, expresado sólo durante un corto tiempo y luego destruido. Ello puede ser útil si el objetivo es la expresión transitoria de un gen.

La transformación de células animales por cualquiera de las técnicas descritas puede presentar dificultades. El DNA foráneo generalmente se inserta al azar en el cromosoma. Incluso cuando el DNA foráneo contiene una secuencia similar a una secuencia del cromosoma huésped que pueda dirigir su integración en esta posición, el número de integrados no homólogos continúa superando el número de integrados dirigidos en varios órdenes de magnitud. Si la integración daña genes esenciales puede alterar las funciones celulares (sin embargo, la mayor parte de las células animales son diploides o poliploides, por lo que una integración normalmente deja una copia inalterada de cualquier gen).

Un resultado particularmente indeseable de la integración sería la activación inadvertida de un gen que estimulara la división celular y que creara una célula cancerosa. Aunque tal eventualidad fue considerada como improbable, pruebas recientes le atribuyen una probabilidad significativa (Recuadro 9–2). Finalmente, el sitio de integración también puede determinar el nivel de expresión de un gen integrado, porque los integrados no se transcriben al mismo nivel en cualquier lugar del genoma.

A pesar de estos problemas, la transformación de células animales se ha empleado frecuentemente para estudiar la estructura de los cromosomas, así como la función, la regulación y la expresión de genes. La introducción con éxito de DNA recombinante en el interior de un animal puede ilustrarse con un experimento que permitió alterar un carácter físico hereditario fácilmente observable. La microinyección de DNA en los núcleos de óvulos fertilizados de ratón puede producir una transformación eficiente (integración cromosómica). Una vez inyectados, los óvulos se introducen en una hembra de ratón y se dejan desarrollar. El nuevo gen a menudo se expresa en algunos de los ratones recién nacidos. Examinando la descendencia, es posible identificar los ejemplares cuya línea germinal haya sido alterada. Mediante cruces adecuados, se puede establecer una línea de ratones **transgénicos** en la que todos los ratones sean homozigóticos para el nuevo o los nuevos genes. Se han obtenido ratones transgénicos con una amplia variedad de variantes genéticas, muchas relacionadas con enfermedades humanas y su control, que abren el camino de la terapia génica en humanos (Recuadro 9–2). Se utiliza una metodología similar para generar ratones con un gen determinado inactivado ("ratones genosuprimidos"), como una forma de establecer su función. Esta tecnología fue usada para introducir en ratones defectos génicos que ayudasen a controlar la obesidad (véase la Fig. 23–34).

Creación de ratones transgénicos

La capacidad de transformar el genoma de los animales no se limita a los ratones. El pez cebra, un pez tropical de acuario muy común, es también un importante organismo modelo **(Fig. 9–33)**. Es posible encontrar en cualquier tienda de animales nuevas cepas de pez cebra con el genoma alterado para que exprese una de las variantes de la proteína verde fluorescente que emita fluorescencia en alguna de las diferentes regiones del espectro (véase la Fig. 9–15).

FIGURA 9–33 Clonación en vertebrados. La introducción de genes de variantes de la proteína verde fluorescente en diferentes cepas de pez cebra hace que éstos brillen en la oscuridad. Cada variante de GFP emite fluorescencia en una región distinta del espectro, por lo que los peces brillan con colores distintos (rojo, verde o amarillo).

Las nuevas tecnologías pueden facilitar el descubrimiento de nuevos fármacos

Es difícil resumir las muchas formas con las que la genómica y la proteómica pueden facilitar el desarrollo de nuevos fármacos. Algunos ejemplos servirán para ilustrarlo. La hipertensión, el fallo cardíaco congestivo, la hipercolesterolemia y la obesidad se tratan con fármacos que alteran la fisiología humana. Las terapias se basan en la identificación de un enzima o receptor implicado en el proceso o en el descubrimiento de un inhibidor que interfiera en su acción. La proteómica jugará un papel creciente en la identificación de potenciales dianas farmacológicas. Por ejemplo, el vasoconstrictor más potente conocido es la hormona peptídica urotensina II. Descubierta en el fluido espinal de los peces, la urotensina II es un pequeño péptido cíclico, de 11 aminoácidos en humanos y de 12 o 13 en otros organismos. La vasocons-

RECUADRO 9–2 MEDICINA El genoma humano y la terapia génica humana

A medida que la biotecnología fue ganando impulso en la década de 1980, un enfoque racional para el tratamiento de las enfermedades genéticas era sumamente atractivo. En principio, puede introducirse DNA en el interior de las células humanas para corregir deficiencias genéticas heredadas. La corrección genética puede incluso dirigirse a un tejido específico mediante la inoculación a un individuo de un virus recombinante específico de tejido que contenga el DNA que haya que introducir en las células deficientes. El objetivo es fascinante, pero el camino está plagado de obstáculos.

La alteración del DNA cromosómico conlleva riesgos importantes, que no pueden ser evaluados en las primeras etapas de la investigación. Por ello las primeras experiencias de terapia génica se aplicaron a unas pocas enfermedades. Científicos y expertos en ética desarrollaron conjuntamente una serie de condiciones exigibles a la experimentación, entre las que se encuentran las siguientes: (1) el defecto genético debe ser monogenético y estar bien caracterizado; (2) tanto el gen normal como el mutante tienen que haber sido clonados y secuenciados; (3) a falta de una técnica para eliminar el gen mutante, el gen funcional debe funcionar bien en presencia del gen mutante, y (4) finalmente, la más importante, los riesgos inherentes a la terapia deben ser menores que los asociados a la enfermedad. Los protocolos para las pruebas clínicas en humanos fueron revisados por grupos de científicos de varias naciones desde el punto de vista del rigor científico y de las exigencias éticas y evaluados por un conjunto de asesores seleccionados en cada país; sólo entonces comenzaron los ensayos en humanos.

Entre los primeros objetivos de la terapia génica se encontraban el cáncer y las enfermedades genéticas del sistema inmunitario. La inmunidad corre a cargo de leucocitos (glóbulos blancos) de diferentes tipos, derivados todos ellos de células madre indiferenciadas de la médula ósea. Estas células se dividen rápidamente y tienen requerimientos metabólicos especiales. La diferenciación puede bloquearse de diversas maneras y dar lugar a una dolencia denominada deficiencia inmunitaria combinada grave (SCID). Una de las formas de la SCID resulta de defectos heredados genéticamente del gen que codifica la adenosina desaminasa (ADA), un enzima implicado en la biosíntesis de nucleótidos (estudiada en el Capítulo 22). Otra forma de SCID resulta de un defecto en el receptor proteico de superficie de la célula que responde a las señales químicas denominadas citoquinas, que desencadenan la diferenciación. En ambos casos, las células madre progenitoras no pueden diferenciarse en células inmunitarias maduras, tales como los linfocitos T y B (véase la p. 170). Los niños con estas raras enfermedades humanas son susceptibles a infecciones bacterianas y víricas y a menudo padecen problemas fisiológicos y neurológicos. En ausencia de una terapia efectiva, los niños deben ser confinados en un ambiente estéril. Aproximadamente un 20% de estos niños tienen un hermano con idéntico antígeno leucocitario humano (HLA), que puede actuar de donante para el transplante de médula ósea, procedimiento que puede curar la enfermedad. Los demás niños precisan un tratamiento distinto.

La primera prueba de terapia génica se llevó a cabo en 1990 en los Institutos Nacionales de Salud en Bethesda, Maryland. La paciente era una niña de cuatro años, cuyo sistema inmunitario se había venido abajo a causa de la deficiencia de ADA. Células de la médula ósea de la paciente fueron transformadas en el laboratorio con retrovirus modificados que contenían un gen funcional de ADA; cuando la manipulación de las células se realiza de esta forma en el laboratorio en lugar de en el paciente, el procedimiento se denomina ex vivo. Las células tratadas fueron reintroducidas en la médula ósea de la paciente. Cuatro años más tarde, la niña llevaba una vida normal, iba a la escuela e incluso testificó sobre su experiencia ante el Congreso. Sin embargo, su recuperación no puede atribuirse exclusivamente a la terapia génica. Antes del inicio de las pruebas clínicas de terapia génica se había desarrollado un nuevo tratamiento para la deficiencia de ADA consistente en administrar un complejo de ADA sintética y polietilén glicol (PEG). En muchos pacientes de ADA-SCID la inyección del complejo ADA-PEG permite un cier-

(*continúa en la página siguiente*)

RECUADRO 9–2 MEDICINA **El genoma humano y la terapia génica humana** *(continuación de la página anterior)*

to desarrollo del sistema inmunitario, con ganancia de peso y menos infecciones, aunque el sistema inmunitario no se restablezca por completo. La nueva terapia génica comportaba riesgos y la supresión del tratamiento de inoculación no fue considerada éticamente aceptable. En consecuencia, los participantes en la prueba recibieron ambos tratamientos a la vez, lo que hizo imposible averiguar qué tratamiento era responsable del buen resultado clínico. Sin embargo, la prueba clínica dio una información importante: era posible transferir genes ex vivo a grandes cantidades de leucocitos, y las células que contenían el gen transferido eran identificables muchos años después del tratamiento, lo que hacía suponer que la corrección a largo plazo era posible. Además, el riesgo asociado al uso de vectores retrovíricos era bajo.

A lo largo de la década de 1990 se realizaron centenares de pruebas clínicas de terapia génica dirigidas a paliar numerosas enfermedades genéticas, pero los resultados fueron, en general, desalentadores. Una de las dificultades principales procedía de la ineficiente introducción de nuevos genes en las células. La transformación a menudo fallaba y el número de células transformadas era insuficiente para suprimir la alteración. En las pruebas con ADA, conseguir una población de células transformadas suficiente era especialmente difícil debido a la aplicación de la terapia con ADA-PEG. Normalmente, las células madre con el gen ADA correcto deberían tener un mayor crecimiento que las células no tratadas, con lo cual su población debería aumentar hasta predominar en la médula ósea. Sin embargo, las inyecciones de ADA-PEG a los mismos pacientes permitían que las células no transformadas (deficientes en ADA) vivieran y se desarrollaran, desposeyendo a las células transformadas de la ventaja en el crecimiento necesaria para expandir su población a expensas de las otras.

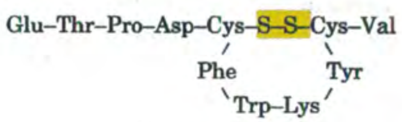
Una prueba de terapia génica iniciada en 1999 dio resultados positivos en la corrección de una forma de SCID causada por receptores defectuosos de las citoquinas (concretamente, de la subunidad denominada γc), según los resultados publicados por investigadores de Francia, Italia y Gran Bretaña. Estos investigadores introdujeron el gen correcto del receptor de la citoquina en células $CD34^+$. (Las células madre que producen las células del sistema inmunitario tienen una proteína denominada CD34 en su superficie; estas células pueden separarse de otras células de la médula ósea con anticuerpos contra CD34.) Las células transformadas fueron devueltas a la médula ósea de los pacientes. En este ensayo, la introducción del gen correcto claramente confirió una ventaja en el crecimiento en relación con las células no tratadas. La funcionalidad del sistema inmunitario se restableció al cabo de 6 a 12 semanas en nueve de los once pacientes y los niveles de los linfocitos T maduros de sistema inmunitario alcanzaron los niveles de sujetos control de la misma edad (que no padecían SCID) al cabo de 6 a 8 meses. La funcionalidad del sistema inmunitario se restableció y casi 4 años más tarde (a mediados de 2003) la mayoría de los niños hacía vida normal. Estos resultados son una demostración palmaria de que la terapia génica puede curar una enfermedad genética grave.

En 2003 se produjo un serio revés. Dos de los pacientes que habían recibido células con el gen del receptor de citoquina correcto desarrollaron una forma grave de leucemia. Durante el tratamiento de terapia génica, uno de los retrovirus introducidos se insertó al azar en el cromosoma de una célula $CD34^+$, causando una expresión anormalmente elevada de un gen denominado LMO-2. La célula afectada se diferenció en una célula T del sistema inmunitario y la elevada expresión de LMO-2 provocó el crecimiento incontrolado de la célula, que causó la leucemia. Los dos pacientes respondieron positivamente a la quimioterapia y ninguno de los otros pacientes tuvo problemas. Este incidente muestra que las reservas iniciales acerca del uso de vectores retrovíricos no carecían de fundamento. Después de la revisión de los protocolos de ensayos de terapia génica, y de la consulta de expertos en ética y de los padres de los niños afectados por estas enfermedades, se han programado nuevos ensayos de terapia génica para niños que no son buenos candidatos para el transplante de médula ósea. La razón es muy sencilla. Se ha considerado que los potenciales beneficios para los niños con estas graves dolencias superan los riesgos demostrados. El desarrollo de nuevos vectores virales parece ser el prerrequisito más importante para conseguir terapias más efectivas.

La terapia génica en humanos no se limita a las enfermedades genéticas. Los tratamientos también se aplican a las células cancerosas, mediante la introducción de genes de proteínas que puedan destruir las células o restablecer el control normal de la división celular. Células del sistema inmunitario asociadas con los tumores, denominadas linfocitos infiltradores de tumores, pueden modificarse genéticamente para producir el factor de la necrosis tumoral (TNF; véase la Fig. 12–51). Cuando estos linfocitos, extraídos de un paciente de cáncer, son modificados e introducidos de nuevo en el paciente, migran hacia el tumor y el TNF producido provoca la regresión del tumor. El SIDA quizás también llegue a tratarse con terapia génica; cabría la posibilidad de introducir DNA que codificara una molécula de RNA complementaria de un mRNA esencial para el HIV en las células del sistema inmunitario (las dianas del HIV). El RNA transcrito a partir del DNA introducido se aparearía con el mRNA del HIV, impidiendo su traducción e interfiriendo así con el ciclo vital del virus. Como alternativa, se podría introducir un gen que codificara una forma inactiva de una subunidad de un enzima del HIV con múltiples subunidades; el enzima entero podría ser inactivado por una subunidad no funcional.

Nuestros conocimientos cada vez mayores del genoma humano y de la base genética de algunas enfermedades vaticinan un diagnóstico temprano y una intervención más eficaz. Sin embargo, como muestran los primeros resultados, el camino que lleve hasta terapias eficaces será largo y con muchos recodos. Hemos de saber más del metabolismo celular, sobre cómo interaccionan los genes y las maneras de afrontar los riesgos. La perspectiva de llegar a vencer los defectos genéticos que destruyen la vida y otras enfermedades proporciona la motivación para no cejar en el esfuerzo.

tricción que provoca puede crear o exacerbar la hipertensión, el fallo cardíaco congestivo y la enfermedad de las arterias coronarias. Algunos de los métodos descritos en la Sección 9.3 para estudiar las interacciones proteína-proteína se han usado para demostrar que la urotensina II se une a un receptor acoplado a una proteína G denominado GPR14. Como veremos en el Capítulo 12, las proteínas G juegan un importante papel en muchas vías de transducción de señales. Sin embargo, GRP14 era un receptor "huérfano", pues, aunque había sido identificado en la secuenciación del genoma humano como un receptor acoplado a la proteína G, su función era desconocida. La asociación de la urotensina II con la GPR14 hace de esta última una diana preferente de las terapias basadas en fármacos que interfieran con la acción de la urotensina II.



Urotensina II

Otro objetivo de la investigación médica es la identificación de nuevos agentes capaces de tratar las enfermedades causadas por patógenos humanos. Actualmente se busca identificar dianas enzimáticas en los patógenos microbianos que puedan inactivarse con un nuevo fármaco. La diana enzimática microbiana ideal debería ser (1) esencial para la supervivencia del patógeno, (2) bien conservada en una amplia variedad de patógenos y (3) ausente o significativamente diferente en humanos. La tarea de identificar procesos metabólicos esenciales para los microorganismos, pero ausentes en humanos, resulta mucho más fácil gracias a la genómica comparada y a la información suministrada por la genómica y la proteómica. ■

La tecnología del DNA recombinante ofrece nuevos productos y nuevas posibilidades

Los productos de la tecnología del DNA recombinante van desde proteínas hasta organismos recombinantes. Con estas técnicas se pueden obtener grandes cantidades de proteínas útiles comercialmente, también se pueden diseñar microorganismos para llevar a cabo tareas especiales y se pueden modificar plantas o animales para dotarlos de características útiles para la agricultura o la medicina. Algunos de estos productos se han aprobado para el consumo o el uso profesional y muchos más se encuentran en fase de desarrollo. En pocos años, la ingeniería genética ha pasado de ser una tecnología prometedora a una industria que mueve muchos miles de millones de dólares, en buena parte en el sector farmacéutico. En la Tabla 9–4 se muestran algunos tipos principales de los nuevos productos.

Uno de estos nuevos productos es la eritropoyetina. Esta hormona proteica (M_r 51.000) estimula la producción de eritrocitos. Los pacientes con enfermedades renales suelen padecer anemia debido a una deficiencia de esta proteína. La eritropoyetina producida por técnicas de ingeniería genética puede utilizarse para el tratamiento de estos pacientes, reduciéndose la necesidad de transfusiones de sangre. ■

Continuamente surgen nuevas aplicaciones de estas tecnologías. Ya se están utilizando enzimas obtenidos por ingeniería genética para producir detergentes, azúcares y quesos. Se usan

TABLA 9–4 Algunos productos del DNA recombinante en medicina

Tipo de producto	Ejemplos /usos
Anticoagulantes	Activador tisular del plasminógeno (TPA); activa la plasmina, un enzima implicado en la disolución de los coágulos; efectivo en el tratamiento de las víctimas de ataques de corazón.
Factores sanguíneos	El factor VIII promueve la coagulación y es deficiente en los hemofílicos. El tratamiento con el factor VIII obtenido por la tecnología del DNA recombinante elimina el riesgo asociado con las transfusiones sanguíneas.
Factores de estimulación de colonias	Factores de crecimiento del sistema inmunitario que estimulan la producción de leucocitos; usado para tratar deficiencias del sistema inmunitario y para combatir infecciones.
Eritropoyetina	Estimula la producción de eritrocitos; utilizado para tratar anemia en pacientes con enfermedades de riñón.
Factores de crecimiento	Estimula la diferenciación y el crecimiento de varios tipos celulares; usado para estimular la curación de heridas.
Hormona de crecimiento humana	Usada para tratar el enanismo.
Insulina humana	Usada para tratar la diabetes.
Interferones	Interfiere en la reproducción vírica; también usado en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.
Interleuquinas	Activa y estimula distintos tipos de leucocitos; posibles usos en la cura de heridas, infección por HIV, cáncer, inmunodeficiencias.
Anticuerpos monoclonales	Extraordinaria especificidad de unión, se usan en ensayos de diagnóstico, para transporte dirigido de fármacos, toxinas o compuestos radiactivos a los tumores en la terapia del cáncer; muchas otras aplicaciones.
Superóxido dismutasa	Evita lesiones tisulares por especies reactivas de oxígeno al restablecer el flujo sanguíneo en tejidos sin O_2 durante cortos períodos de tiempo a causa de intervenciones quirúrgicas.
Vacunas	Las proteínas derivadas de la envuelta vírica son tan eficientes como "cebadores" del sistema inmunitario como los virus inactivos tradicionalmente utilizados para las vacunas, y son más seguras. La primera que se desarrolló fue la vacuna de la hepatitis B.

proteínas modificadas como aditivos alimentarios, suplementos nutritivos, saborizantes y aromatizantes. Se están desarrollando microorganismos con vías metabólicas alteradas o completamente nuevas para extraer petróleo y minerales de depósitos del suelo, para digerir derrames de petróleo y para destoxificar sustancias peligrosas de vertidos de basura y de aguas residuales, o bien para producir etanol como carburante. Las plantas modificadas con una mayor resistencia frente a la sequía, la congelación, las plagas y las enfermedades aumentan el rendimiento de los cultivos y a la vez reducen las necesidades de sustancias químicas en la agricultura. Se pueden clonar animales completos, introduciendo un núcleo entero con todo su material genético en un óvulo preparado cuyo núcleo haya sido extraído.

Las extraordinarias posibilidades de la biotecnología moderna no están exentas de controversias. La clonación de mamíferos desafía las convenciones sociales y puede estar acompañada de serias deficiencias en la salud y la longevidad de los animales clonados. Del mismo modo que pueden producirse fármacos útiles, también pueden serlo toxinas para la guerra biológica. Los riesgos potenciales de la liberación de plantas u otros organismos modificados en la biosfera tienen que ser vigilados con atención. Las consecuencias a largo plazo de esta tecnología sobre nuestra especie y sobre el medio ambiente son imposibles de prever, pero exigirán un conocimiento cada vez más profundo del metabolismo celular y de la ecología.

RESUMEN 9.4 Alteraciones del genoma y nuevos productos biotecnológicos

- Los progresos de la secuenciación de genomas completos y de los métodos de ingeniería genética están mejorando nuestra capacidad de modificar el genoma de cualquier especie.
- La clonación en plantas, que utiliza el vector plasmídico Ti de *Agrobacterium*, hace posible la introducción de nuevos caracteres vegetales.
- En la clonación en animales se introduce el DNA foráneo principalmente mediante vectores víricos o por microinyección. Con estas técnicas pueden obtenerse animales transgénicos y desarrollarse nuevos métodos para la terapia génica en humanos.
- La utilización de la genómica y la proteómica en la investigación básica y farmacéutica está acelerando el descubrimiento de nuevos fármacos. La biotecnología también está contribuyendo a la expansión de nuevos productos y tecnologías.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

clonación 304
vector 304
DNA recombinante 304
endonucleasas de restricción 304
DNA ligasa 304
plásmido 307
cromosoma bacteriano artificial (BAC) 309
cromosoma artificial de levadura (YAC) 310
mutagénesis dirigida 312
proteína de fusión 313
etiqueta 313
etiqueta His 314
genómica 315
biblioteca genómica 315
cóntigo 315
sitio identificado por secuencia (STS) 315
DNA complementario (cDNA) 316
genoteca de cDNA 316
secuencia de identificación expresada (EST) 316
epítopo de identificación 317
reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 317
huella dactilar de DNA 319
polimorfismos de secuencia 319
polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) 319
repeticiones cortas en tándem (STR) 319
transferencia Southern 319
polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) 323
proteoma 324
proteómica 324
biología de sistemas 324
ortólogos 325
sintenia 325
microchip de DNA 325
plásmido Ti 330
transgénico 334

Bibliografía

General

Jackson, D.A., Symons, R.H., & Berg, P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2904–2909.
El primer experimento de DNA recombinante en que se unieron DNA de organismos diferentes.

Lobban, P.E. & Kaiser, A.D. (1973) Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **78**, 453–471.
El primer experimento de DNA recombinante.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
A pesar de haber sido desplazado por manuales más recientes, esta serie de tres volúmenes incluye mucha información útil sobre los principios biológicos, químicos y físicos, tanto de las técnicas clásicas como de otras todavía en uso.

Clonación de genes

Arnheim, N. & Erlich, H. (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 131–156.

Giepmans, B.N.G., Adams, S.R., Ellisman, M.H., & Tsien, R.Y. (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217–224.

Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M., & Paabo, S. (2001) Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 353–359.
Éxitos y fracasos en la recuperación de DNA de muestras antiguas.

Ivanov, P.L., Wadhams, M.J., Roby, R.K., Holland, M.M., Weedn, V.W., & Parsons, T.J. (1996) Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat. Genet.* **12**, 417–420.

Lindahl, T. (1997) Facts and artifacts of ancient DNA. *Cell* **90**, 1–3.
Una buena descripción de cómo afecta la química del DNA a la recuperación de DNA en arqueología.

Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems *App. Microbiol. Biotech.* **72**, 211–222.

Genómica

Bamshad, M. & Wooding, S.P. (2003) Signatures of natural selection in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 99A–111A.

Aplicaciones del genoma humano al estudio de la evolución humana.

Budowle, B., Johnson, M.D., Fraser, C.M., Leighton, T.J., Murch, R.S., & Chakraborty, R. (2005) Genetic analysis and attribution of microbial forensics evidence. *Crit. Rev. Microbiol.* **31**, 233–254.

La biotecnología en la lucha contra el bioterrorismo.

Carroll, S.B. (2003) Genetics and the making of *Homo sapiens*. *Nature* **422**, 849–857.

Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. (2005) Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* **427**, 69–87.

Collins, F.S., Green, E.D., Guttmacher, A.E., & Guyer, M.S. (2003) A vision for the future of genomics research. *Nature* **422**, 835–847.

Dennis, C. (2005) Branching out. *Nature* **437**, 17–19.

Cómo podemos aprender acerca de nosotros mismos mediante la secuenciación del genoma de otros primates.

Hill, R.S. & Walsh, C.A. (2005) Molecular insights into human brain evolution. *Nature* **437**, 64–66.

Cómo la genómica puede enseñarnos a comprender los rasgos humanos y su evolución.

International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–945.

Koonin, E.V. (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 309–338.

Una buena descripción de la genómica comparada básica.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.

Discusión del borrador del genoma elaborado por el Proyecto internacional del genoma humano. En este ejemplar se encuentran muchos otros artículos interesantes.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–1351.

Descripción del borrador de la secuencia del genoma humano producido por Celera Corporation. Muchos otros artículos del mismo ejemplar contienen información adicional.

Proteómica

Pandey, A. & Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837–846.

Una descripción especialmente lograda de las diversas estrategias y métodos utilizados para identificar proteínas y sus funciones.

Stoughton, R.B. (2005) Applications of DNA microarrays in biology. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 53–82.

Zhu, H., Bilgin, M., & Snyder, M. (2003) Proteomics. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 783–812.

Biotecnología aplicada

Foster, E.A., Jobling, M.A., Taylor, P.G., Donnelly, P., de Knijff, P., Mieremet, R., Zerjal, T., & Tyler-Smith, C. (1999) The Thomas Jefferson paternity case. *Nature* **397**, 32.

Último artículo de una serie dedicada a las aplicaciones de la biotecnología al estudio de casos de interés histórico.

Hansen, G. & Wright M.S. (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* **4**, 226–231.

Lapham, E.V., Kozma, C., & Weiss, J. (1996) Genetic discrimination: perspectives of consumers. *Science* **274**, 621–624.

Ventajas e inconvenientes de conocer el propio genoma.

Mahowald, M.B., Verp, M.S., & Anderson, R.R. (1998) Genetic counseling: clinical and ethical challenges. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 547–559.

Ohlstein, E.H., Ruffolo, R.R., Jr., & Elliott, J.D. (2000) Drug discovery in the next millennium. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 177–191.

Thompson, J. & Donkersloot, J.A. (1992) *N*-(Carboxyalkyl) amino acids: occurrence, synthesis, and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 517–557.

Resumen de la estructura y la función biológica de las opinas.

Verma, I.M. & Weitzman, M.D. (2005) Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 711–738.

Una buena descripción de las posibilidades y limitaciones de esta tecnología en el momento presente.

Problemas

1. Clonación Al unir dos o más fragmentos de DNA la secuencia en el lugar de unión se puede diseñar de muchas formas, como se muestra en los siguientes ejercicios.

(a) Dibuje la estructura de cada extremo de un fragmento de DNA lineal producido por digestión con *Eco*RI (incluyendo las secuencias remanentes de la secuencia de reconocimento de *Eco*RI).

(b) Dibuje la estructura resultante de la reacción de la DNA polimerasa I con el extremo de esta secuencia en presencia de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (véase la Fig. 8–33).

(c) Escriba la secuencia de la unión que resulta si se ligan dos extremos con la estructura derivada de (b) (véase la Fig. 25–17).

(d) Dibuje la estructura resultante si la estructura derivada de (a) se trata con una nucleasa que sólo degrade DNA monohebra.

(e) Escriba la secuencia producida en la zona de unión si un extremo con la estructura (b) se liga con un extremo con la estructura (d).

(f) Dibuje la estructura de un extremo de un fragmento de DNA lineal producido por una digestión con *Pvu*II (incluyendo las secuencias remanentes de las secuencias de reconocimiento de *Pvu*II).

(g) Escriba la secuencia producida en la zona de unión de un extremo con la estructura (b) y un extremo con la estructura (f).

(h) Suponga que se puede sintetizar un fragmento corto de DNA dúplex de cualquier secuencia deseada. Con este fragmento sintético y con los procedimientos descritos de (a) a (g), diseñe un protocolo para eliminar el lugar de restricción *Eco*RI de la molécula de DNA e introducir un nuevo sitio de restricción para *Bam*HI en aproximadamente la misma localización (véase la Figura 9–2).

(i) Diseñe cuatro fragmentos cortos de DNA sintético de doble cadena que permitan la ligación de la estructura (a) con un fragmento de DNA producido por una digestión con *Pst*I. En uno de estos fragmentos sintéticos, diseñe la secuencia de manera que la unión final contenga las secuencias de reconocimiento tanto para *Eco*RI como para *Pst*I, respectivamente. En el segundo y tercer fragmentos, diseñe las secuencias de tal modo que la unión contenga sólo el lugar de reconocimiento para *Eco*RI o para *Pst*I, respectivamente. Diseñe la secuencia del cuarto fragmento de tal modo que en la región de unión no aparezca ni la secuencia para *Eco*RI ni la de *Pst*I.

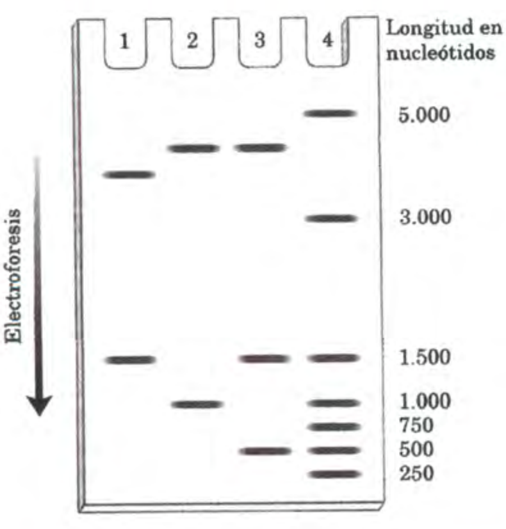
2. Selección de plásmidos recombinantes Cuando se clona un fragmento de DNA foráneo en un plásmido, en general es útil insertar el fragmento en un lugar que interrumpa un marcador seleccionable (tal como el gen de resistencia a la tetraciclina de pBR322). La pérdida de la función del gen interrumpido se puede aprovechar para identificar clones que contengan plás-

midos recombinantes con DNA foráneo. Con el bacteriófago λ como vector, este criterio de selección es innecesario; no obstante, los vectores que han incorporado grandes fragmentos de DNA se distinguen fácilmente de los que no lo han hecho. ¿Cómo se identifican estos vectores recombinantes?

3. Clonación de DNA El vector de clonación plasmídico pBR322 (véase la Fig. 9–3) se corta con la endonucleasa de restricción *Pst*I. Un fragmento de DNA aislado de un genoma eucariótico (también producido por corte con *Pst*I) se mezcla y se liga con el vector así preparado. A continuación, la mezcla de DNA ligados se usa para transformar bacterias, y aquellas que contienen plásmidos se seleccionan por crecimiento en presencia de tetraciclina.

(a) Además de los plásmidos recombinantes deseados, ¿qué otros tipos de plásmidos se pueden encontrar en las bacterias transformadas resistentes a la tetraciclina? ¿Cómo pueden distinguirse?

(b) El fragmento de DNA clonado tiene una longitud de 1.000 pb, y tiene un lugar de restricción para *Eco*RI a 250 pb de uno de los extremos. Tres plásmidos recombinantes diferentes cortados con *Eco*RI y analizados por electroforesis en gel dieron los patrones mostrados en la figura. ¿Qué información puede obtenerse sobre el DNA clonado a partir de cada patrón? Observe que en el pBR322 los sitios de restricción para *Pst*I y *Eco*RI se encuentran separados por 750 pb. El plásmido entero sin inserto tiene 4.361 pb. El número de nucleótidos de los fragmentos del marcador de tamaño del carril 4 están indicados.



4. Identificación de un gen de una proteína con una secuencia de aminoácidos conocida Con ayuda de la Figura 27–7 para traducir el código genético, diseñe una sonda de DNA que permita identificar el gen de una proteína con la siguiente secuencia aminoterminal. La sonda ha de tener entre 18 y 20 nucleótidos de longitud, un tamaño que permite una especificidad adecuada si hay suficiente homología entre la sonda y el gen.

H_3N^+–Ala–Pro–Met–Thr–Trp–Tyr–Cys–Met–
Asp–Trp–Ile–Ala–Gly–Gly–Pro–Trp–Phe–Arg–
Lys–Asn–Thr–Lys–

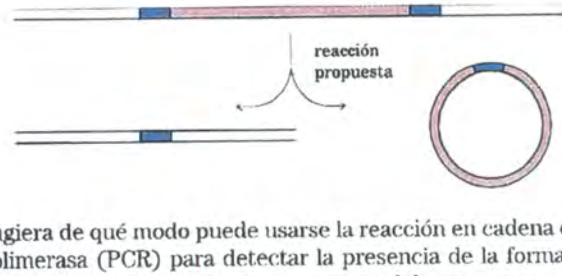
5. Diseño de un ensayo para el diagnóstico de una enfermedad genética La enfermedad de Huntington (EH) es una dolencia neurodegenerativa hereditaria, caracterizada por la pérdida gradual e irreversible de las funciones psicológicas, motoras y cognitivas. Los síntomas generalmente hacen su aparición en la madurez, pero pueden presentarse prácticamente a cualquier edad. El curso de la enfermedad puede prolongarse de 15 a 20 años. Las bases moleculares de la enfermedad son cada vez mejor comprendidas. La mutación genética causante de la EH ha sido localizada en un gen que codifica una proteína (M_r 350.000), cuya función es desconocida. En individuos que no desarrollarán la enfermedad, se encuentra una serie de 6 a 39 codones CAG (para la glutamina), repetidos en sucesión en la región que codifica el aminoterminal de la proteína. En los individuos en los cuales aparece la EH en la madurez este codón está repetido generalmente de 40 a 55 veces. En los casos de aparición en la infancia, este codón está repetido más de 70 veces. La longitud de la repetición del trinucleótido indica si un individuo desarrollará la enfermedad y aproximadamente a qué edad aparecerán los primeros síntomas.

A continuación se muestra una pequeña porción de la secuencia codificante aminoterminal del gen de 3.143 codones de la EH. La secuencia de nucleótidos del DNA se muestra en negro, la secuencia de aminoácidos correspondiente al gen en azul y la repetición de CAG está sombreada. Con ayuda de la Figura 27–7 para traducir el código genético, proponga un análisis basado en la PCR para el diagnóstico de la EH, que pudiera realizarse con una muestra de sangre. Suponga que el cebador para la PCR tenga 25 nucleótidos. Por convención, salvo indicación contraria, las secuencias codificantes de proteína se representan con la hebra codificante (la secuencia idéntica al mRNA transcrito a partir del gen) arriba, de modo que se lea de 5′ a 3′, de izquierda a derecha.

```
307 ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC
1    M  A  T  L  E  K  L  M  K  A  F  E  S  L  K  S  F

358 CAGCAGTTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
18   Q  Q  F  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q

409 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCCGCCGCCGCCGCCG
35   Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  P  P  P  P  P  P  P  P

460 CCGCCTCCTCAGCTTCCTCAGCCGCCGCCG
52   P  P  P  Q  L  P  Q  P  P  P
```

Fuente: The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-983.

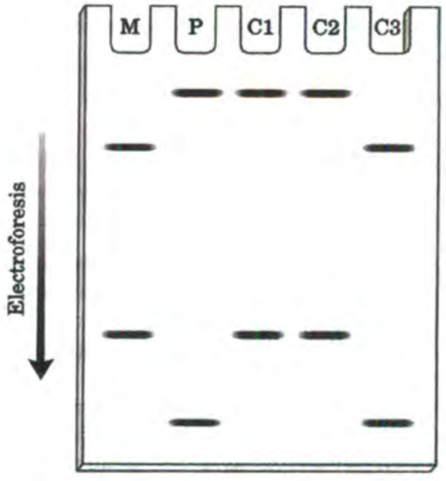
6. Aplicación de la PCR a la detección de moléculas de DNA circulares Un segmento de DNA genómico de un protozoo ciliado ocasionalmente es eliminado. La supresión es una reacción programada genéticamente, asociada al apareamiento celular. Es posible que la eliminación resulte de un tipo de recombinación denominada recombinación específica de sitio en la que se empalman los dos extremos del DNA y el DNA eliminado origina un producto circular.



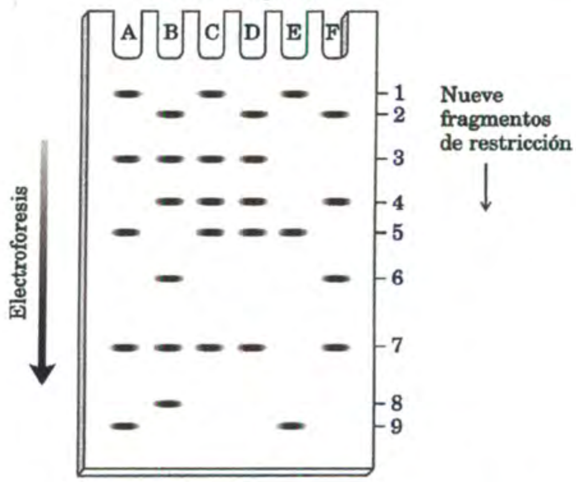
Sugiera de qué modo puede usarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de la forma circular del DNA eliminado en un extracto del protozoo.

7. Plantas luminosas Una planta modificada para expresar la proteína verde fluorescente, regada normalmente en tierra de jardín ordinaria, brillará en la oscuridad (véase la Fig. 9–15a), mientras que una planta modificada para expresar la luciferasa de luciérnaga no lo hará (véase la Fig. 9–29). Explique estas observaciones.

8. Análisis de paternidad por RFLP Los análisis de huella del DNA y de RFLP se usan a menudo para investigar la paternidad. Un niño hereda cromosomas a la vez del padre y de la madre; por ello su DNA muestra fragmentos de restricción derivados de ambos progenitores. En el gel que aquí se muestra, ¿qué niño puede ser excluido como descendiente biológico del padre? Justifique su razonamiento. El carril M corresponde a la madre, P al padre y C1, C2 y C3 a los hijos.

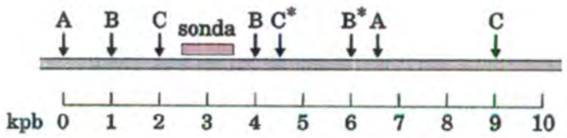


9. Cartografiado de un segmento cromosómico Se aísla un grupo de clones solapados, designados de A a F, de una región de un cromosoma. Se corta cada uno de los clones por separado con un enzima de restricción y los trozos se separan por electroforesis en gel de agarosa, con los resultados que se muestran abajo en la figura. En esta región cromosómica hay nueve fragmentos de restricción distintos, una parte de los cuales está presente en cada clon. A partir de esta información, deduzca el orden de los fragmentos de restricción en el cromosoma.



10. Clonación en plantas La estrategia indicada en la Figura 9–28 emplea células de *Agrobacterium* que contienen dos plásmidos distintos. Sugiera por qué las secuencias de los dos plásmidos no se combinan en uno solo.

11. Huella del DNA por análisis de RFLP Se extrae el DNA de las células sanguíneas de dos individuos diferentes, individuos 1 y 2. En experimentos separados, el DNA de cada individuo se corta con las endonucleasas de restricción A, B y C, y los fragmentos se separan por electroforesis. Se muestra el mapa hipotético de un fragmento de 10.000 pares de bases de un cromosoma humano (1kpb = 1.000 pb). El individuo 2 tiene mutaciones puntuales que eliminan los sitios de restricción B* y C*. Se incuba el gel con un oligonucleótido radiactivo complementario de la secuencia indicada y se expone un film de rayos X en contacto con el gel. Indique dónde se verían las bandas en el film. Los carriles del gel están indicados en la figura adjunta.



12. Aplicación de la fotolitografía en la producción de microchips de DNA La Figura 9–21 muestra los primeros pasos del proceso de elaboración de un microchip de DNA mediante fotolitografía. Describa los pasos restantes necesarios para obtener las secuencias deseadas (una secuencia de cuatro nucleótidos diferente en cada uno de los cuatro puntos) mostradas en el primer panel de la figura. Después de cada paso, indique la secuencia nucleotídica resultante unida a cada punto.

13. Clonación en mamíferos Los vectores retrovíricos descritos en la Figura 9–32 hacen posible la integración eficiente de DNA foráneo en un genoma de mamífero. Explique cómo estos vectores, que carecen de los genes para la replicación y el empaquetamiento del virus (*gag, pol, env*), se ensamblan en partículas víricas infecciosas. Sugiera por qué es importante que estos vectores carezcan de los genes para la replicación y el empaquetamiento.

Problema de análisis de datos

14. *Hinc*II: La primera endonucleasa de restricción El descubrimiento del primer enzima de restricción con utilidad práctica fue publicado en dos artículos en 1970. En el primer artículo, Smith y Wilcox describieron el aislamiento de un enzima que cortaba el DNA de doble cadena. Inicialmente, demostraron la actividad nucleasa del enzima midiendo la disminución de la viscosidad de muestras de DNA tratadas con el enzima.

(a) ¿Por qué el tratamiento con una nucleasa disminuye la viscosidad de una disolución de DNA?

Los autores determinaron si el enzima era una endo- o una exonucleasa tratando el DNA marcado con ^{32}P con el enzima y a continuación añadiendo ácido tricloroacético (TCA). En las condiciones usadas en el experimento los nucleótidos individuales eran solubles en TCA y los oligonucleótidos precipitaban.

(b) El tratamiento del DNA marcado con ^{32}P con nucleasa no dio lugar a material marcado con ^{32}P soluble en TCA. Según ésto ¿el enzima es una endo- o una exonucleasa? Explique la respuesta.

Cuando se corta un polinucleótido, el fosfato normalmente no es eliminado, sino que permanece unido al extremo 5′ o 3′ del fragmento de DNA resultante. Smith y Wilcox determinaron la localización del fosfato en el fragmento creado por la nucleasa a través de los siguientes pasos:

1. Trataron el DNA no marcado con la nucleasa.
2. Trataron una muestra (A) del producto con γ-^{32}P ATP y polinucleótido quinasa (que puede unir el fosfato γ del ATP al 5′ OH, pero no al fosfato 5′ o al 3′ OH o al fosfato 3′). Midieron la cantidad de ^{32}P incorporado en el DNA.
3. Trataron otra muestra (B) del producto del paso 1 con fosfatasa alcalina (que elimina los grupos fosfato de los extremos 5′ y 3′ libres) y a continuación con polinucleótido quinasa y γ-^{32}P ATP. Midieron la cantidad de ^{32}P incorporado en el DNA.

(c) Smith y Wilcox encontraron que la muestra A tenía 136 cuentas/min de ^{32}P; la muestra B tenía 3.740 cuentas/min. ¿El corte con la nucleasa dejó el fosfato en el extremo 5′ o en el 3′ de los fragmentos de DNA? Justifique su respuesta.

(d) El tratamiento del DNA del bacteriófago T7 con la nucleasa dio aproximadamente 40 fragmentos específicos de diversas longitudes. ¿Por qué este resultado está de acuerdo con que el enzima reconozca una secuencia específica en el DNA en lugar de realizar cortes de doble cadena al azar?

Llegados a este punto, todavía hay dos posibilidades para el corte en sitios específicos: (1) que el corte ocurriese en el sitio de reconocimiento o (2) cerca del sitio de reconocimiento, pero no dentro de la secuencia reconocida. Para abordar este aspecto, Kelly y Smith determinaron la secuencia de los extremos 5′ de los fragmentos de DNA generados por la nucleasa mediante los siguientes pasos:

1. Trataron el DNA del fago T7 con el enzima.
2. Trataron los fragmentos resultantes con fosfatasa alcalina para eliminar los fosfatos en 5′.
3. Trataron los fragmentos desfosforilados con polinucleótido quinasa y γ-^{32}P ATP para marcar los extremos 5′.
4. Trataron las moléculas marcadas con DNasas para fragmentarlas y obtener una mezcla de mono-, di- y trinucleótidos.
5. Determinaron la secuencia de los mono-, di- y trinucleótidos marcados comparándolos con oligonucleótidos de secuencia conocida por cromatografía en capa fina.

Los productos marcados se identificaron como sigue: mononucleótidos: A y G; dinucleótidos: 5′-pApA-3′ y 5′-pGpA-3′; trinucleótidos: 5′-pApApC-3′ y 5′-pGpApC-3′.

(e) ¿Qué modelo de corte está de acuerdo con estos resultados? Justifique la respuesta.

Kelly y Smith prosiguieron con la identificación de la secuencia de los extremos 3′ de los fragmentos. Encontraron una mezcla de 5′-pTpC-3′ y 5′-pTpT-3′. No determinaron la secuencia de ningún trinucleótido en el extremo 3′.

(f) Sobre la base de estos datos ¿cuál es la secuencia de reconocimiento de la nucleasa y en qué lugar de la secuencia se corta el DNA? Use la Tabla 9–2 como modelo para su respuesta.

Referencias

Kelly, T.J. & Smith, H.O. (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: II. Base sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* **51**, 393–409.

Smith, H.O. & Wilcox, K.W. (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* **51**, 379–391.

> La sustancia grasa, separada de las bases salificables se disolvió en alcohol hirviente. Al enfriarse se obtuvo cristalizada y muy pura, sometiéndose a examen en este estado. Ya que no se ha descrito hasta el momento[...] propongo llamarla margarina, del nombre griego que significa perla, ya que una de sus características es la de tener aspecto de nácar que comunica a algunas de las combinaciones que forma con las bases salificables.
>
> —*Michel-Eugène Chevreul, artículo en* Philosophical Magazine, *1814*

10

Lípidos

Los lípidos biológicos constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua. Las funciones biológicas de los lípidos son tan diversas como su química. En muchos organismos, las grasas y los aceites son las formas principales de almacenamiento energético mientras que los fosfolípidos y los esteroles constituyen los principales elementos estructurales de las membranas biológicas. Otros lípidos, aun estando presentes en cantidades relativamente pequeñas, juegan papeles cruciales como cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, pigmentos que absorben la luz, anclas hidrofóbicas para proteínas, "chaperonas" que ayudan en el plegamiento de las proteínas de membrana, agentes emulsionantes en el tracto digestivo, hormonas y mensajeros intracelulares. Este capítulo describe los lípidos representativos de cada tipo, organizados según sus papeles funcionales, poniendo énfasis en su estructura química y propiedades físicas. Aunque seguimos una organización funcional en la presentación, los, literalmente, miles de lípidos diferentes también se pueden organizar en ocho categorías generales de estructura química (véase la Tabla 10–3). La oxidación de los lípidos productora de energía se trata en el Capítulo 17 y su síntesis en el Capítulo 21.

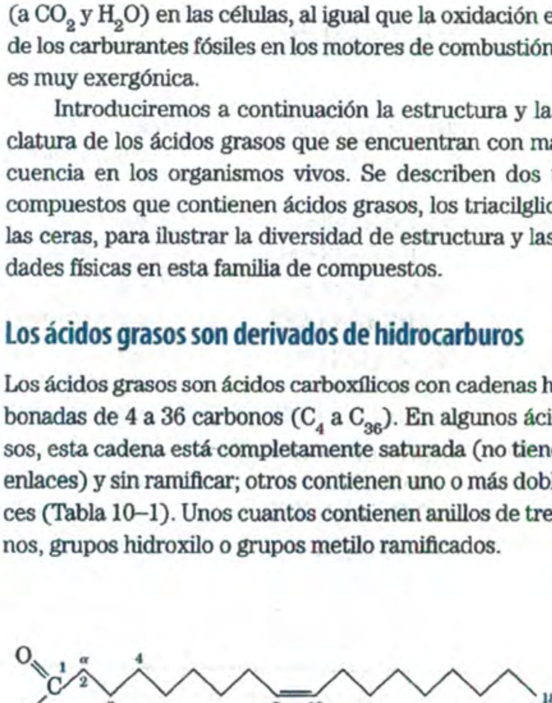
10.1 Lípidos de almacenamiento

Las grasas y aceites, utilizados casi universalmente como formas de almacenamiento de energía en los organismos vivos, son compuestos derivados de los **ácidos grasos.** Los ácidos grasos son derivados hidrocarbonados con un nivel de oxidación casi tan bajo (esto es, tan reducidos) como el de los hidrocarburos de los combustibles fósiles. La oxidación de los ácidos grasos (a CO_2 y H_2O) en las células, al igual que la oxidación explosiva de los carburantes fósiles en los motores de combustión interna, es muy exergónica.

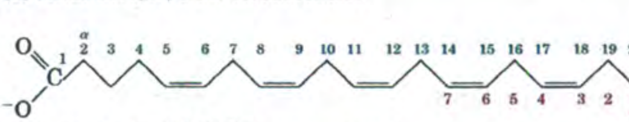
Introduciremos a continuación la estructura y la nomenclatura de los ácidos grasos que se encuentran con mayor frecuencia en los organismos vivos. Se describen dos tipos de compuestos que contienen ácidos grasos, los triacilgliceroles y las ceras, para ilustrar la diversidad de estructura y las propiedades físicas en esta familia de compuestos.

Los ácidos grasos son derivados de hidrocarburos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos (C_4 a C_{36}). En algunos ácidos grasos, esta cadena está completamente saturada (no tiene dobles enlaces) y sin ramificar; otros contienen uno o más dobles enlaces (Tabla 10–1). Unos cuantos contienen anillos de tres carbonos, grupos hidroxilo o grupos metilo ramificados.



(a) Ácido 18:5(Δ^9) *cis*-9-octadecenoico



(b) Ácido 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$) icosapentaenoico (EPA) un ácido graso omega-3

FIGURA 10–1 Dos convenciones en la nomenclatura de los ácidos grasos. (a) Nomenclatura estándar en la que asigna el número 1 al carbono carboxílico (C-1) y α al carbono vecino. La posición de cualquier doble o dobles enlaces se indica mediante Δ seguido de un exponente que indica el carbono con el número inferior en el doble enlace. **(b)** En el caso de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) una convención alternativa numera los carbonos en la dirección opuesta, en la que se asigna el número 1 al carbono metílico en el otro extremo de la cadena; este carbono también se denomina ω (omega; última letra del alfabeto griego). Las posiciones de los dobles enlaces se indican en relación al carbono ω.

TABLA 10–1 Algunos ácidos grasos naturales: estructura, propiedades y nomenclatura

Esqueleto carbonado	Estructura*	Nombre sistemático†	Nombre común (etimología)	Punto de fusión (°C)	Solubilidad a 30 °C (mg/g disolvente) Agua	Benceno
12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	Ácido *n*-dodecanoico	Ácido láurico (del latín *laurus*, laurel)	44,2	0,063	2.600
14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Ácido *n*-tetradecanoico	Ácido mirístico (del latín *Myristica*, género de la nuez moscada)	53,9	0,024	874
16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Ácido *n*-hexadecanoico	Ácido palmítico (del griego *palma*, palmera)	63,1	0,0083	348
18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Ácido *n*-octadecanoico	Ácido esteárico (del griego, *stear*, grasa dura)	69,6	0,0034	124
20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	Ácido *n*-icosanoico	Ácido araquídico (del latín *Arachis*, género de legumbre)	76,5		
24:0	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	Ácido *n*-tetracosanoico	Ácido lignocérico (del latín *lignum*, madera + *cera*, cera)	86,0		
16:1(Δ^9)	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-9-hexadecenoico	Ácido palmitoleico	1 a –0,5		
18:1(Δ^9)	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-9-octadecenoico	Ácido oleico (del latín *oleum*, aceite)	13,4		
18:2($\Delta^{9,12}$)	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-*cis*-9, 12-octadecadienoico	Ácido linoleico (del griego *linon*, lino)	1–5		
18:3($\Delta^{9,12,15}$)	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-*cis*-*cis*-9,12,15-octadecatrienoico	α-Ácido linolénico	−11		
20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$	Ácido *cis*-*cis*-*cis*-*cis*-5,8,11,14-icosatetraenoico	Ácido araquidónico	−49,5		

* Todos los ácidos se muestran en su forma no ionizada. A pH 7, todos los ácidos grasos libres tienen un carboxilato ionizado. Obsérvese que la numeración de los carbonos empieza en el carbono del grupo carboxílico.

† El prefijo *n*- indica la estructura "normal" sin ramificar. Por ejemplo, "dodecanoico" indica simplemente 12 átomos de carbono que se podrían disponer en una serie de formas ramificadas; "*n*-dodecanoico" especifica la forma lineal sin ramificar. En los ácidos grasos insaturados, se indica la configuración de cada uno de los dobles enlaces; en los ácidos grasos biológicos la configuración es siempre cis.

CONVENCIÓN CLAVE: Una nomenclatura simplificada de ácidos grasos sin ramificar especifica la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces separados por dos puntos **(Fig. 10–1a)**; así, el ácido palmítico, que tiene 16 átomos de carbono y es saturado, se abrevia 16:0 y el ácido oleico de 18 carbonos con un doble enlace es 18:1. Las posiciones de los dobles enlaces se especifican en relación con el carbono carboxílico, al que se da el número 1, por exponentes que siguen a una Δ (delta); un ácido graso de 20 carbonos con un doble enlace entre C-9 y C-10 (C-1 es el carbono carboxílico) y otro entre C-12 y C-13, se designa 20:2($\Delta^{9,12}$). ■

Los ácidos grasos más abundantes tienen números pares de átomos de carbono en una cadena sin ramificar de entre 12 y 24 carbonos (Tabla 10–1). Tal como veremos en el Capítulo 21, el número par de carbonos es consecuencia de la forma de síntesis de estos compuestos que utiliza la condensación sucesiva de unidades de acetato (de dos carbonos).

La posición de los dobles enlaces también sigue un patrón regular; en la mayoría de ácidos grasos monoinsaturados el doble enlace se encuentra entre C-9 y C-10 (Δ^9) mientras que los restantes dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados son generalmente Δ^{12} y Δ^{15}. (El ácido araquidónico es una excepción a esta generalización.) Los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados casi nunca son conjugados (alternancia de enlaces dobles y sencillos como en —CH═CH—CH═CH—) sino que están separados por un grupo metileno (—CH═CH—CH₂—CH═CH—) (Fig. 10–1b). Los dobles enlaces de casi todos los ácidos grasos naturales se encuentran en la configuración cis. Los ácidos grasos trans se producen durante la fermentación en el rumen de los animales productores de lácteos y carne.

CONVENCIÓN CLAVE: La familia de **ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)** con un doble enlace entre el tercer y cuarto carbono desde el extremo metilo de la cadena tienen una importancia especial en la nutrición humana. Debido a que el papel fisiológico de los PUFA está más relacionado con el primer doble enlace desde el extremo *metilo* de la cadena que del extremo carboxilo, se utiliza, a veces, una nomenclatura alternativa para estos ácidos grasos. El carbono del grupo metilo, esto es, el carbono más alejado del grupo carboxílico, se denomina carbono ω (omega) y se le da el número 1 (Fig. 10–1b). En esta convención, los PUFA con un doble enlace entre C-3 y C-4 se denominan **ácidos grasos omega-3 (ω-3)** y los que tienen un doble enlace entre C-6 y C-7 son los **ácidos grasos omega-6 (ω-6).** ■

Los humanos requieren el PUFA omega-3 ácido α-linolénico (ALA; 18:3($\Delta^{9,12,15}$) según la convención estándar) pero no tienen la capacidad enzimática para sintetizarlo, por lo que han de obtenerlo a partir de la dieta. A partir del ALA, los humanos pueden sintetizar otros dos PUFA omega-3 que son importantes en la función celular: el ácido icosapentaenoico (EPA; 20:5 ($\Delta^{5,8,11,14,17}$), mostrado en la Fig. 10-1b) y el ácido docosahexenoico (DHA; 22:6 ($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$)). El desequilibrio de los PUFA omega-6 y omega-3 en la dieta está asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. La proporción óptima de PUFA omega-6 a omega-3 está entre 1:1 y 4:1, pero la proporción en la dieta de la mayoría de norteamericanos está entre 10:1 y 30:1 aproximadamente, lo que comporta una mayor frecuencia de enfermedades cardíacas y embolias. La "dieta mediterránea" que se ha asociado a un riesgo cardiovascular disminuido es más rica en PUFA omega-3, obtenidos de las ensaladas y de los aceites de pescado. Estos últimos son especialmente ricos en EPA y DHA, por lo que se recetan a menudo suplementos de aceites de pescado a los individuos con una historia de enfermedad cardiovascular. ■

Las propiedades físicas de los ácidos grasos y de los compuestos que los contienen vienen determinadas en gran parte por la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada. La cadena hidrocarbonada apolar explica la escasa solubilidad de los ácidos grasos en agua. El ácido láurico (12:0, M_r 200), por ejemplo, tiene una solubilidad de 0,063 mg/g de agua muy inferior a la de la glucosa (M_r 180) que es de 1.100 mg/g de agua. Cuanto más larga sea la cadena acílica grasa y menor el número de dobles enlaces, menor es la solubilidad en agua. El grupo ácido carboxílico es polar (y está ionizado a pH neutro) lo que justifica la ligera solubilidad en agua de los ácidos grasos de cadena corta.

Los puntos de fusión están también muy influidos por la longitud y grado de saturación de la cadena hidrocarbonada. A temperatura ambiente (25 °C), los ácidos grasos saturados desde 12:0 a 24:0 tienen una consistencia cérea, mientras que los ácidos grasos insaturados de estas longitudes son líquidos oleosos. Esta diferencia en los puntos de fusión se debe a los diferentes grados de empaquetamiento de las moléculas de los ácidos grasos **(Fig. 10–2)**. En los compuestos totalmente saturados, la rotación libre alrededor de cada enlace carbono-carbono confiere gran flexibilidad a la cadena hidrocarbonada; la conformación más estable es la forma totalmente extendida, en la que los impedimentos estéricos entre átomos vecinos están reducidos al mínimo. Estas moléculas se pueden empaquetar fuertemente en ordenamientos casi cristalinos con contactos por uniones de van der Waals entre átomos a lo largo de la propia cadena y átomos de cadenas vecinas. En los ácidos grasos insaturados, un doble enlace cis provoca un doblamiento en la cadena hidrocarbonada. Los ácidos grasos con uno o más doblamientos de este tipo no se pueden empaquetar tan fuertemente como los ácidos grasos totalmente saturados, por lo que las interacciones entre ellos son más débiles. Dado que se necesita menos energía térmica para desordenar estos conjuntos poco ordenados de ácidos grasos insaturados, éstos tienen puntos de fusión claramente más bajos que los ácidos grasos saturados de la misma longitud de cadena (Tabla 10–1).

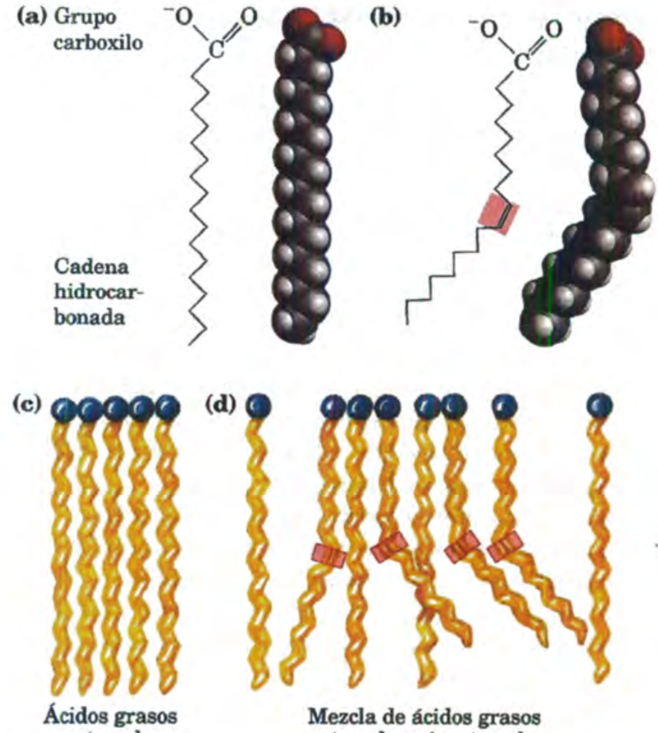


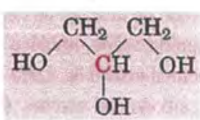
FIGURA 10–2 Empaquetamiento de los ácidos grasos en agregados estables. El grado de empaquetamiento depende de su grado de saturación. **(a)** Dos representaciones del ácido graso saturado, ácido esteárico (estearato a pH 7), se muestran en su conformación normal extendida. Cada línea del zigzag representa un enlace sencillo entre carbonos adyacentes. **(b)** El doble enlace cis (sombreado) del ácido oleico 18:1 (Δ^9) (oleato) no le permite la rotación e introduce un giro rígido en la cola hidrocarbonada. Todos los demás enlaces de la cadena pueden rotar libremente. **(c)** Los ácidos grasos totalmente saturados en la forma extendida se empaquetan en ordenamientos casi cristalinos estabilizados por muchas interacciones hidrofóbicas. **(d)** La presencia de uno o más ácidos grasos con dobles enlaces cis interfiere con este empaquetamiento apretado dando lugar a agregados menos estables.

En los vertebrados los ácidos grasos libres (ácidos grasos no esterificados, con un grupo carboxilato libre) circulan por la sangre unidos de forma no covalente a una proteína portadora, la albúmina sérica. No obstante, los ácidos grasos en su mayoría se encuentran presentes en el plasma sanguíneo en forma de derivados del ácido carboxílico tales como ésteres o amidas. Al carecer del grupo carboxilato cargado, estos derivados de los ácidos grasos son generalmente aún menos solubles en agua que los ácidos grasos libres.

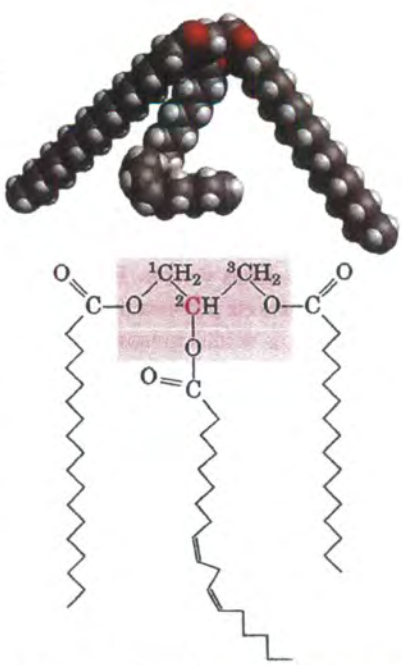
Los triacilgligeroles son ésteres de ácidos grasos y glicerol

Los lípidos más sencillos obtenidos a partir de los ácidos grasos son los **triacilgliceroles,** también denominados triglicéridos, grasas o grasas neutras. Los triacilgliceroles están compuestos de tres ácidos grasos unidos por enlace éster con un solo glicerol **(Fig. 10–3)**. Los que contienen el mismo tipo de ácido graso en las tres posiciones se denominan triacilgliceroles simples y se denominan según el ácido graso que contienen. La triestearina, la tripalmitina y la trioleína son, respectivamente, ejemplos de triacilgliceroles sencillos que contienen 16:0, 18:0 y 18:1. La mayoría de los triacilgliceroles naturales son mixtos; éstos contienen dos o más ácidos grasos diferentes. Se han de especificar el nombre y posición de cada ácido graso para designar sin ambigüedades estos compuestos.

Dado que los hidroxilos polares del glicerol y los carboxilatos polares de los ácidos grasos están unidos por enlaces éster, los triacilgliceroles son moléculas apolares, hidrofóbicas, prácticamente insolubles en agua. Los lípidos tienen densidades específicas menores que el agua, lo que explica por qué las mezclas de agua y aceite (aceite y vinagre para aliñar la ensalada, por ejemplo) tienen dos fases: el aceite, con menor densidad específica, flota sobre la fase acuosa.



Glicerol



1-Estearil, 2-linoleil, 3-palmitil glicerol, un triacilglicerol mixto

FIGURA 10–3 Glicerol y un triacilglicerol. El triacilglicerol mixto representado en esta figura tiene tres ácidos grasos diferentes unidos al armazón de glicerol. Cuando hay dos ácidos grasos diferentes en C-1 y C-3 del glicerol, el C-2 se transforma en un centro quiral (p. 16).

Los triacilgliceroles aportan energía almacenada y aislamiento

En la mayoría de células eucarióticas, los triacilgliceroles forman una fase separada de gotitas microscópicas oleosas en el citosol acuoso que sirven como depósito de combustible metabólico. Las células especializadas de los vertebrados, denominadas adipocitos o células grasas, almacenan grandes cantidades de triacilgliceroles en forma de gotitas de grasa que ocupan casi totalmente la célula **(Fig. 10–4a)**. Los triacilgliceroles se almacenan también, en forma de aceite, en las semillas de muchos tipos de plantas, proporcionando energía y precursores biosintéticos durante la germinación de las semillas (Fig. 10–4b). Los adipocitos y las semillas en germinación contienen **lipasas,** enzimas que catalizan la hidrólisis de los triacilgliceroles almacenados, liberando ácidos grasos que son exportados a otros lugares donde se requieren como combustible.

En tanto que combustibles almacenados, los triacilgliceroles tienen dos ventajas significativas sobre polisacáridos ta-

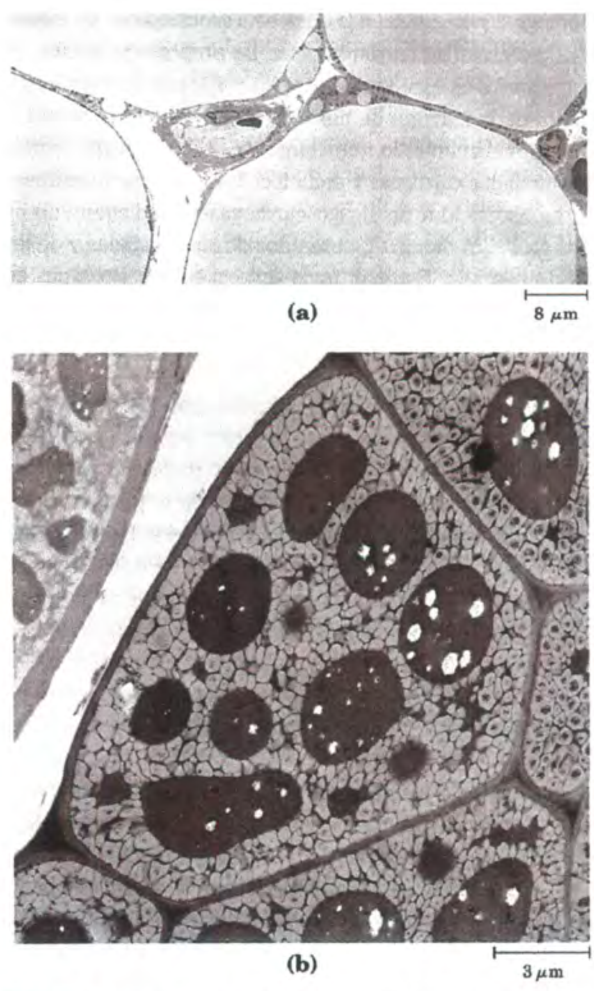


FIGURA 10–4 Almacenes de grasa en las células. (a) Sección transversal de cuatro adipocitos de cobaya que muestran grandes gotículas de grasa que llenan prácticamente las células. También son visibles varios capilares en sección transversal. **(b)** Sección transversal de una célula de cotiledón de una semilla de la planta *Arabidopsis*. Las amplias estructuras oscuras son cuerpos proteicos que están rodeados por aceites almacenados en los cuerpos oleosos de coloración clara.

les como el glucógeno o el almidón. En primer lugar los átomos de carbono de los ácidos grasos están más reducidos que los de los azúcares por lo que la oxidación de los triacilgliceroles proporciona más del doble de energía, gramo por gramo, que la de los glúcidos. En segundo lugar, como los triacilgliceroles son hidrofóbicos y, por consiguiente, no hidratados, el organismo que transporta combustible en forma de grasa no ha de transportar el peso adicional del agua de hidratación asociada con los polisacáridos almacenados (2 g por gramo de polisacárido). El tejido graso en los humanos (formado principalmente por adipocitos), se encuentra debajo de la piel, en la cavidad abdominal y en las glándulas mamarias. Las personas moderadamente obesas pueden tener de 15 a 20 kg de triacilgliceroles depositados en sus adipocitos, lo que es suficiente para cubrir sus necesidades energéticas durante varios meses solamente con sus depósitos de grasa. Por el contrario, el cuerpo humano no puede almacenar ni las necesidades energéticas de un día en forma de glucógeno. Los glúcidos tales como la glucosa y el glucógeno ofrecen ciertas ventajas como fuentes rápidas de energía metabólica siendo una de ellas su fácil solubilidad en agua.

En algunos animales, los triacilgliceroles almacenados debajo de la piel no sólo sirven como almacenes de energía sino como aislamiento contra las bajas temperaturas. Las focas, las morsas, los pingüinos y otros animales polares de sangre caliente están ampliamente protegidos con triacilgliceroles. En los animales hibernantes (por ejemplo, los osos) las enormes reservas de grasa acumuladas antes de la hibernación también tienen una doble misión: aislamiento y depósito de energía (véase el Recuadro 17–1). La baja densidad de los triacilgliceroles constituye la base de otra función notable de estos compuestos. En los cachalotes, un almacén de triacilgliceroles y de ceras les permite a los animales igualar la flotación de sus cuerpos con la de la zona a su alrededor en las inmersiones profundas en agua fría (Recuadro 10–1).

La hidrogenación parcial de los aceites de cocina produce ácidos grasos

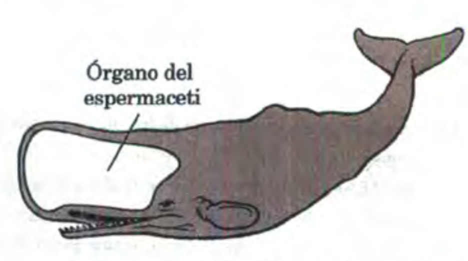
La mayoría de grasas naturales tales como los aceites vegetales, los productos lácteos y las grasas animales son mezclas complejas de triacilgliceroles sencillos y mixtos. Estos últimos contienen diversos ácidos grasos que difieren en la longitud de la cadena y grado de saturación **(Fig. 10–5)**. Los aceites vegetales tales como el aceite de maíz y el de oliva están compuestos mayoritariamente por triacilgliceroles con ácidos grasos insaturados por lo que son líquidos a temperatura ambiente. Los triacilgliceroles que sólo contienen ácidos gra-

RECUADRO 10–1 Cachalotes: cabezones de las profundidades

Los estudios sobre los cachalotes han puesto al descubierto otro aspecto en el que los triacilgliceroles son biológicamente útiles. La cabeza del cachalote es muy grande, constituyendo alrededor de un tercio del peso corporal total. Alrededor del 90% del peso de la cabeza está constituido por el órgano del espermaceti, una masa grasa que contiene hasta 3.600 kg (unas 4 toneladas) de aceite de espermaceti, una mezcla de triacilgliceroles y ceras con un contenido abundante de ácidos grasos insaturados. Esta mezcla es líquida a la temperatura normal de reposo del cachalote, unos 37 °C, pero empieza a cristalizar hacia los 31 °C y se vuelve sólida cuando la temperatura desciende varios grados más.

La función biológica probable del aceite de espermaceti se ha deducido de investigaciones sobre la anatomía y el comportamiento nutritivo del cachalote. Estos mamíferos se alimentan casi exclusivamente de calamares en aguas muy profundas. En sus inmersiones descienden 1.000 m o más; la inmersión récord es de 3.000 m (casi 2 millas). A estas profundidades el cachalote no tiene competidores por el calamar, que es muy abundante. El cachalote permanece quieto esperando que pasen los bancos de calamares.

Para que un animal marino pueda permanecer a una profundidad determinada, sin un esfuerzo natatorio constante, ha de tener la misma densidad que el agua que lo rodea. El cachalote puede variar su flotabilidad de manera que sea igual a la densidad de su alrededor, desde la superficie del océano tropical hasta las grandes profundidades en donde el agua es mucho más fría y, por consiguiente, tiene una mayor densidad. La clave es el punto de congelación del aceite de espermaceti. Cuando la temperatura del aceite desciende varios grados durante una inmersión profunda, se congela o cristaliza haciéndose más denso con lo que cambia la flotabilidad de la ballena que se iguala a la densidad del agua de mar. Existen diversos mecanismos fisiológicos que promueven el enfriamiento rápido del aceite durante la inmersión. Durante el retorno a la superficie el aceite de espermaceti congelado vuelve a calentarse y se funde disminuyendo su densidad para igualar la del agua superficial. Vemos de este modo una adaptación anatómica y bioquímica notable en el cachalote. Los triacilgliceroles y las ceras sintetizados por el cachalote contienen ácidos grasos con la longitud de cadena y el grado de saturación necesarios para conferir al aceite de espermaceti el punto de fusión adecuado para los hábitos de inmersión del animal.



Desgraciadamente para la población de cachalotes, el aceite de espermaceti se consideró en ciertas épocas el mejor para lámparas de aceite y continúa siendo valioso comercialmente por su utilización como lubricante. Varios siglos de caza intensiva de estos mamíferos ha hecho que los cachalotes estén en la lista de especies en peligro de extinción.

sos saturados, tales como la triestearina, el componente principal de la grasa de buey, son sólidos blancos y grasos a temperatura ambiente.

Cuando los alimentos ricos en grasas se exponen demasiado tiempo al oxígeno del aire se pueden estropear volviéndose rancios. El gusto y olor desagradables asociados con el enranciamiento provienen de la rotura oxidativa de los dobles enlaces de ácidos grasos insaturados que produce aldehídos y ácidos carboxílicos de cadena más corta y, por consiguiente, de mayor volatilidad. Con el fin de mejorar las condiciones de caducidad de los aceites vegetales utilizados para cocinar y con el fin de aumentar su estabilidad a las altas temperaturas alcanzadas, los aceites vegetales comerciales se someten a hidrogenación parcial. Este proceso convierte gran parte de sus dobles enlaces cis en enlaces sencillos lo que aumenta la temperatura de fusión de los aceites, por lo que son casi sólidos a temperatura ambiente (la margarina se produce de esta manera a partir de aceites vegetales). La hidrogenación parcial tiene otro efecto, éste indeseable: algunos dobles enlaces cis se convierten en dobles enlaces trans. Actualmente existen muchas pruebas de que la ingestión con la dieta de ácidos grasos trans (a menudo conocidos como "grasas trans") está en la base de una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, por lo que evitando estas grasas en la dieta se reduce el riesgo de enfermedad coronaria. Los ácidos grasos trans de la dieta aumentan la concentración de triacilgliceroles y de colesterol ligado a LDL ("malo") en la sangre al tiempo que disminuyen la concentración de colesterol ligado a HDL ("bueno"), cambios que por sí solos son suficientes para aumentar el riesgo de enfermedad coronaria. Los ácidos grasos trans aún pueden tener más efectos adversos. Parece que, por ejemplo, aumentan la respuesta inflamatoria corporal, lo cual es otro riesgo de enfermedad cardíaca. (Véase el Capítulo 21 para una descripción del colesterol LDL y HDL –lipoproteína de baja densidad y lipoproteína de alta densidad– y sus efectos sobre la salud.)

Muchos alimentos preparados (fast food) están fritos a elevadas temperaturas con aceites vegetales parcialmente hidrogenados por lo que contienen niveles elevados de ácidos grasos trans (Tabla 10–2). En vista de los efectos perjudiciales de estas grasas, algunos países (Dinamarca, por ejemplo) y algunas ciudades (Nueva York y Filadelfia) restringen severamente la utilización de aceites parcialmente hidrogenados en los restaurantes. Actualmente, las patatas fritas preparadas en un restaurante fast food en Dinamarca casi no contienen cantidades detectables de ácidos grasos trans mientras que el mismo producto preparado en Estados Unidos contiene entre 5 y 10 g de ácidos grasos trans por ración (Tabla 10–2). Los efectos perjudiciales de las grasas trans tienen lugar con ingestas de 2 a 7 g por día (20 a 60 kcal en una ingesta calórica diaria de 2.000 kcal; obsérvese que una caloría nutricional es el equivalente de la kilocaloría utilizada por químicos y bioquímicos, por lo que una dieta de 2.000 calorías es el equivalente de una dieta de 2.000 kcal). ¡Una sola ración de patatas fritas en un restaurante de Estados Unidos puede contener esta cantidad de ácido graso trans! Muchos otros alimentos preparados, de bo-

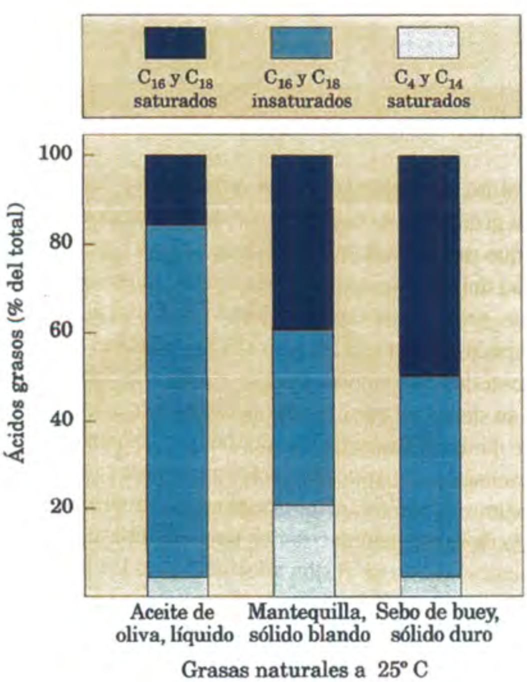


FIGURA 10–5 Composición en ácidos grasos de tres alimentos grasos. El aceite de oliva, la mantequilla y el sebo de buey están formados por mezclas de triacilgliceroles que difieren en su composición de ácidos grasos. Los puntos de fusión de estas grasas —y de aquí su estado físico a temperatura ambiente (25 °C)— dependen de su composición de ácidos grasos. El aceite de oliva tiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados de cadena larga (C_{16} y C_{18}) que explica su estado líquido a 25 °C. La mayor proporción de ácidos grasos saturados de cadena larga (C_{16} y C_{18}) en la mantequilla incrementa su punto de fusión, por lo que la mantequilla es un sólido blando a temperatura ambiente. El sebo de buey, con una proporción aún mayor de ácidos grasos saturados de cadena larga, es un sólido duro.

TABLA 10–2 Ácidos grasos trans en algunos productos industriales y en comidas rápidas

	Contenido en ácidos grasos trans	
	En una ración típica (g)	**% sobre el total de ácidos grasos**
Patatas fritas	4,7–6,1	28–36
Hamburguesa de pescado rebozado	5,6	28
Hamburguesa de pollo rebozado	5,0	25
Pizza	1,1	9
Tortilla de maíz	1,6	22
Donut	2,7	25
Muffin	0,7	14
Chocolatinas	0,2	2

Fuente: Adaptado de la Tabla 1 en Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, P.H., Stampfer, M.J., & Willet, W.C. (2006) Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1604–1605.

Nota: Todos los datos pertenecen a alimentos preparados con aceite vegetal parcialmente hidrogenado servidos en Estados Unidos en 2002.

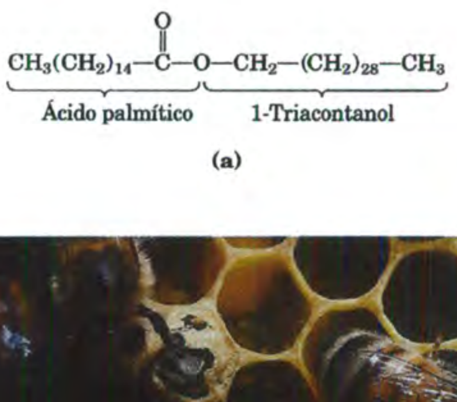
llería y bocadillos en las estanterías de supermercados tienen niveles elevados comparables de grasas trans. ■

Las ceras sirven como almacenes de energía y como cubiertas impermeables al agua

Las ceras biológicas son ésteres de ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados (C_{14} a C_{36}) con alcoholes de cadena larga (C_{16} a C_{30}) **(Fig. 10–6)**. Sus puntos de fusión (60 a 100 °C) son generalmente más elevados que los de los triacilgliceroles. En el plancton, constituido por microorganismos marinos flotantes de vida libre que se encuentran en la base de la cadena alimentaria para los animales marinos, las ceras son la forma de almacenamiento principal de combustible metabólico.

Las ceras también realizan diversas funciones, que están relacionadas con sus propiedades repelentes del agua y con su consistencia firme. Ciertas glándulas de la piel de los vertebrados secretan ceras para proteger el pelo y la piel manteniéndolos flexibles, lubricados e impermeables. Las aves, especialmente las acuáticas, secretan ceras que mantienen la impermeabilidad de sus plumas. Las hojas brillantes del acebo, de los rododendros, de la hiedra venenosa y de muchas plantas tropicales están recubiertas con una espesa capa de ceras que las protege contra parásitos e impide la evaporación excesiva del agua.

Las ceras biológicas tienen diversas aplicaciones en las industrias farmacéutica, cosmética y otras. La lanolina (de la lana de oveja), la cera de abeja (Fig. 10–6), la cera de carnauba (de una palmera brasileña) y el aceite de espermaceti (de las ballenas; véase el Recuadro 10–1) se utilizan ampliamente en la fabricación de lociones, ungüentos y pulimentos.



(a)

(b)

FIGURA 10–6 Cera biológica. **(a)** El triacontanilpalmitato, componente mayoritario de la cera de abeja, es un éster del ácido palmítico con el alcohol triacontanol. **(b)** Un panal, construido con cera de abeja, es rígido a 25 °C y totalmente impermeable al agua.

RESUMEN 10.1 Lípidos de almacenamiento

- Los lípidos son componentes celulares insolubles en agua y de estructuras diversas que se pueden extraer con disolventes apolares.
- Casi todos los ácidos grasos, que proporcionan el componente hidrocarbonado de los lípidos, tienen un número par (generalmente 12 a 24) de átomos de carbono pudiendo ser saturados o insaturados; los dobles enlaces tienen casi siempre la configuración cis.
- Los triacilgliceroles contienen tres moléculas de ácido graso esterificadas con los tres grupos hidroxilo del glicerol. Los triacilgliceroles sencillos sólo contienen un tipo de ácido graso; los triacilgliceroles mixtos contienen dos o tres tipos diferentes. Los triacilgliceroles son mayoritariamente grasas de almacenamiento; se encuentran en muchos tipos de alimentos.
- La hidrogenación parcial de aceites vegetales en la industria alimentaria convierte algunos dobles enlaces cis en dobles enlaces con la configuración trans. Los ácidos grasos trans de la dieta constituyen un factor de riesgo importante para la enfermedad coronaria cardíaca.

10.2 Lípidos estructurales de las membranas

La característica arquitectónica central de las membranas biológicas es una doble capa lipídica que constituye una barrera al paso de moléculas polares y de iones. Los lípidos de las membranas son anfipáticos; un extremo de la molécula es hidrofóbico y el otro hidrofílico. Las interacciones hidrofóbicas entre ellos y las hidrofílicas con el agua dirigen su empaquetamiento hacia la formación de láminas llamadas bicapas membranosas. En esta sección se describen cinco tipos generales de lípidos de membrana: glicerofosfolípidos, en los que las regiones hidrofóbicas están compuestas por dos ácidos grasos unidos al glicerol; galactolípidos y sulfolípidos, que también tienen dos ácidos grasos esterificados con el glicerol pero que carecen del fosfato característico de los fosfolípidos; lípidos tetraéter de las arqueobacterias, en los que dos cadenas alquílicas muy largas están unidas mediante enlace éter al glicerol de ambos extremos; esfingolípidos, en los que se une un solo ácido graso a una amina grasa, la esfingosina; y esteroles, que son compuestos que se caracterizan por tener un sistema rígido de cuatro anillos hidrocarbonados fusionados.

Las partes hidrofílicas de estos compuestos anfipáticos pueden ser muy sencillas, por ejemplo un simple grupo —OH en un extremo del sistema anular de los esteroles, o pueden ser mucho más complejas. Los glicerofosfolípidos y algunos esfingolípidos contienen un grupo polar que se une a una porción hidrofóbica mediante un enlace fosfodiéster; son los **fosfolípidos.** Otros esfingolípidos carecen de grupo fosfato pero tienen un azúcar sencillo u oligosacáridos complejos en sus extremos polares; son los **glucolípidos (Fig. 10–7)**. Dentro de estas clases de lípidos de membrana existe una enorme diversidad debido a las diferentes combinaciones de "colas" de ácidos grasos y "cabezas" polares. El ordenamiento de estos lípidos en forma de membranas y sus papeles estructurales y funcionales en las mismas se tratan en el capítulo siguiente.

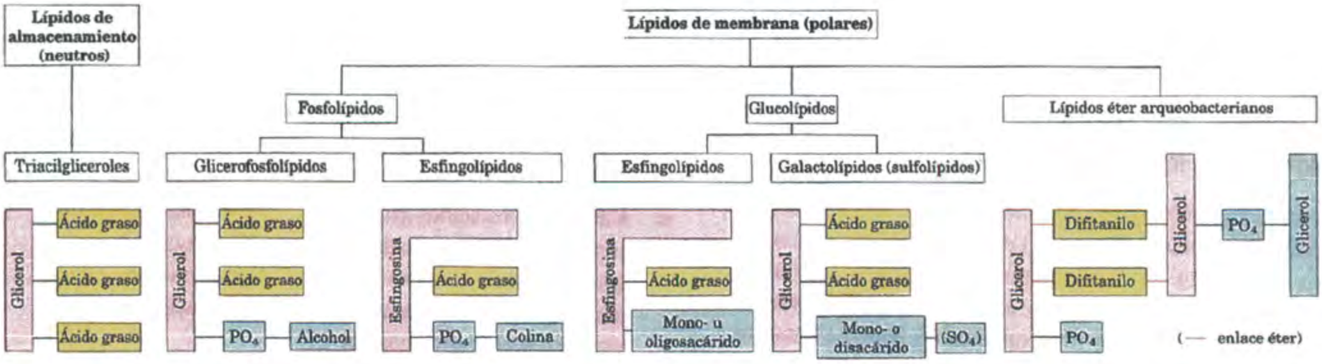
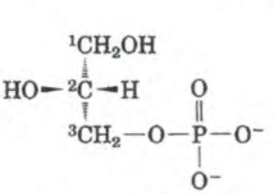


FIGURA 10–7 Algunos tipos comunes de lípidos de almacenamiento y de membrana. Todos los tipos de lípidos que se muestran tienen como armazón el glicerol o la esfingosina (recuadros rosas) al que se unen uno o más grupos alquilo de cadena larga (amarillo) y un grupo de cabeza polar (azul). En los triacilgliceroles, glicerofosfolípidos, galactolípidos y sulfolípidos, los grupos alquilo son ácidos grasos en enlace éster. Los esfingolípidos contienen un solo ácido graso formando enlace amida con el armazón de esfingosina. Los lípidos de membrana de las arqueobacterias son variables; el que se muestra aquí tiene dos cadenas alquilo muy largas y ramificadas con sus extremos formando un enlace éter con una porción de glicerol. En los fosfolípidos, el grupo de cabeza polar está unido a través de un enlace fosfodiéster, mientras que los glucolípidos tienen una unión glucosídica directa entre el azúcar del grupo de cabeza y el armazón de glicerol.

Los glicerofosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico

Los **glicerofosfolípidos,** también llamados fosfoglicéridos, son lípidos de membrana en los que dos ácidos grasos están unidos por enlace éster al primer y segundo carbonos del glicerol y un grupo de cabeza muy polar o cargado está unido por enlace fosfodiéster al tercer carbono. El glicerol es proquiral; no tiene carbonos asimétricos pero la unión del fosfato a cualquiera de los dos extremos lo convierte en un compuesto quiral que se denomina correctamente L-glicerol 3-fosfato o D-glicerol 1-fosfato o *sn*-glicerol 3-fosfato **(Fig. 10–8)**. Los glicerofosfolípidos, derivados del ácido fosfatídico **(Fig. 10–9)**, se nombran según el alcohol polar en el grupo de cabeza. Por ejemplo, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina tienen colina y etanolamina en sus grupos polares de cabeza. En todos estos compuestos, el grupo de cabeza se une al glicerol mediante un enlace fosfodiéster en el que el grupo fosfato tiene una carga negativa a pH neutro. El alcohol



L-Glicerol 3-fosfato
(*sn*-glicerol 3-fosfato)

FIGURA 10–8 El L-glicerol 3-fosfato, armazón de los fosfolípidos. El glicerol en sí no es quiral, ya que tiene un plano de simetría a través del C-2. Sin embargo, el glicerol es proquiral, ya que puede convertirse en un compuesto quiral al añadir un sustituyente tal como el fosfato a cualquiera de los dos grupos —CH_2OH. Una nomenclatura sin ambigüedades para el glicerol fosfato es el sistema DL (descrito en la p. 74), en el que los isómeros se nombran según su relación estereoquímica con los isómeros del gliceraldehído. Según este sistema el estereoisómero del glicerol fosfato que se encuentra en la mayoría de lípidos se nombra correctamente como L-glicerol 3-fosfato o como D-glicerol 1-fosfato. Otra manera de especificar los estereoisómeros es el sistema *sn* (numeración estereoespecífica) en el que C-1 es, por definición, el grupo del compuesto proquiral que ocupa la posición pro-S. La forma común del glicerol fosfato en los fosfolípidos es, según este sistema, *sn*-glicerol 3-fosfato.

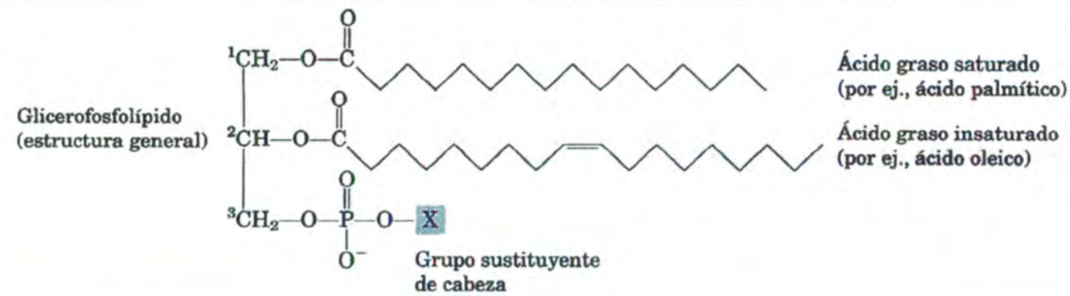
polar puede estar cargado negativamente (tal como sucede en el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), ser neutro (fosfatidilserina) o estar cargado positivamente (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina). Estas cargas contribuyen significativamente a las propiedades superficiales de las membranas (véase Capítulo 11).

Los ácidos grasos de los glicerofosfolípidos pueden ser muy variados, por lo que un fosfolípido dado (fosfatidilcolina, por ejemplo) puede estar formado por diversas especies moleculares, cada una con una dotación singular de ácidos grasos. La distribución de las especies moleculares es específica de los distintos organismos, distintos tejidos de un mismo organismo y distintos glicerofosfolípidos en la misma célula o tejido. En general, los glicerofosfolípidos contienen un ácido graso saturado C_{16} o C_{18} en C-1 y un ácido graso insaturado C_{18} o C_{20} en C-2. Con algunas excepciones, se desconoce todavía el significado biológico de la variación de los ácidos grasos y de los grupos de cabeza.

Algunos glicerofosfolípidos tienen ácidos grasos unidos por enlace éter

Algunos tejidos animales y algunos organismos unicelulares son ricos en **lípidos con función éter,** en los que una de las dos cadenas acilo está unida al glicerol con enlace éter en lugar de enlace éster. La cadena unida por enlace éter puede ser saturada, tal como sucede en los lípidos alquílicos con función éter, o puede contener un doble enlace entre C-1 y C-2, tal como sucede en los **plasmalógenos (Fig. 10–10)**. El tejido cardíaco de los vertebrados es único en su riqueza de lípidos con función éter; alrededor de la mitad de los fosfolípidos cardíacos son plasmalógenos. Las membranas de las bacterias halófilas, de los protistas ciliados y de ciertos invertebrados también contienen elevadas proporciones de lípidos con función éter. No se conoce su significación funcional en estas membranas; quizás su resistencia a las fosfolipasas que cortan ácidos grasos unidos por enlace éster de los lípidos de las membranas sea importante en algunos papeles.

Hay al menos un lípido con función éter, el **factor activador plaquetario,** que es una molécula señal importante. Se libera de leucocitos denominados basófilos y estimula la agregación de las plaquetas y la liberación de serotonina (un



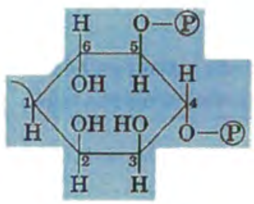
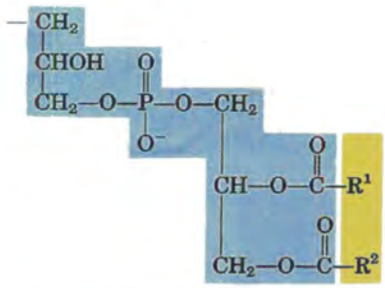
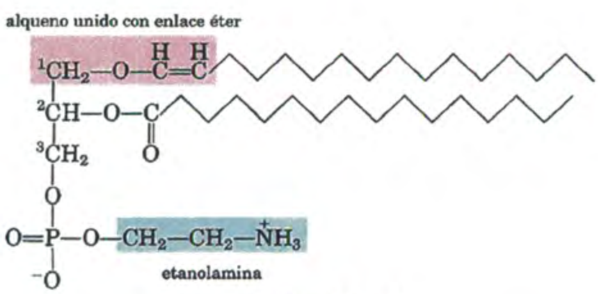
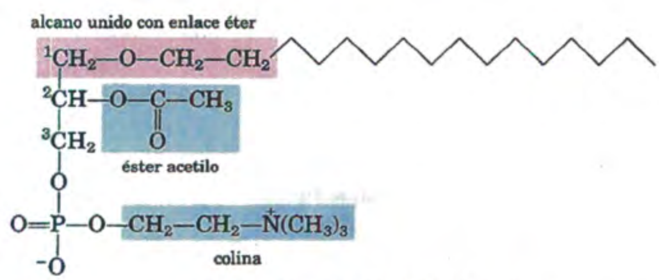
Nombre del glicerofosfolípido	Nombre de X–O	Fórmula de X	Carga neta (a pH 7)
Ácido fosfatídico	—	—H	−1
Fosfatidiletanolamina	Etanolamina	$—CH_2—CH_2—\overset{+}{N}H_3$	0
Fosfatidilcolina	Colina	$—CH_2—CH_2—\overset{+}{N}(CH_3)_3$	0
Fosfatidilserina	Serina	$—CH_2—CH(COO^-)—\overset{+}{N}H_3$	−1
Fosfatidilglicerol	Glicerol	$—CH_2—CH(OH)—CH_2—OH$	−1
Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato	*mio*-Inositol 4,5-bisfosfato		−4
Cardiolipina	Fosfatidilglicerol		−2

FIGURA 10–9 Glicerofosfolípidos. Los glicerofosfolípidos comunes son diacilgliceroles unidos a alcoholes del grupo de cabeza mediante un enlace fosfodiéster. El ácido fosfatídico, un fosfomonoéster, es el compuesto de referencia. Cada derivado se denomina según el alcohol del grupo de cabeza (X), con el prefijo "fosfatidil-". En la cardiolipina, un solo glicerol es compartido por dos ácidos fosfatídicos (R^1 y R^2 son grupos acilo graso).



Plasmalógeno



Factor activador de las plaquetas

FIGURA 10–10 Lípidos con enlaces tipo éter. Los plasmalógenos tienen una cadena alquenílica unida por enlace éter en donde la mayoría de los glicerofosfolípidos tienen un ácido graso unido en enlace éster (compárese con la Fig. 10–9). El factor activador plaquetario tiene una cadena alquílica larga unida por enlace éter al C-1 del glicerol, pero el C-2 está unido por enlace éster al ácido acético, lo que hace que el compuesto sea mucho más hidrosoluble que la mayoría de glicerofosfolípidos y plasmalógenos. El alcohol del grupo de cabeza es la etanolamina en los plasmalógenos y la colina en el factor activador de las plaquetas.

vasoconstrictor) contenida en las mismas. Ejerce también diversos efectos sobre el hígado, el músculo liso, el corazón y los tejidos uterino y pulmonar y juega un papel importante en la inflamación y en la respuesta alérgica. ■

Los cloroplastos contienen galactolípidos y sulfolípidos

El segundo grupo de lípidos de membrana son los que predominan en las células vegetales; los **galactolípidos,** en los que uno o dos residuos galactosa están unidos por enlace glucosídico con el C-3 de un 1,2-diacilglicerol (**Fig. 10–11**; véase también la Fig. 10–7). Los galactolípidos están localizados en las membranas tilacoides (membranas internas) de los cloroplastos; constituyen del 70 al 80% de los lípidos totales de membrana en las plantas vasculares. Son, probablemente, los lípidos de membrana más abundantes en la biosfera. El fosfato es, a menudo, el nutriente del suelo limitante para la planta por lo que, probablemente, la presión evolutiva para conservar el fosfato para papeles más críticos favoreció el que las plantas fabriquen lípidos sin fosfato. Las membranas vegetales también contienen sulfolípidos, en los que un residuo de glucosa sulfonado se une a un diacilglicerol por medio de un enlace glucosídico. En los sulfolípidos el sulfonato del grupo de cabeza es portador de una carga negativa, lo mismo que el grupo fosfato de los fosfolípidos (Fig. 10–11).

Las arqueobacterias contienen lípidos de membrana singulares

Las arqueobacterias, la mayoría de las cuales viven en nichos ecológicos bajo condiciones extremas: altas temperaturas (agua hirviente), bajo pH o alta fuerza iónica, por ejemplo, tienen lípidos de membrana que contienen hidrocarburos ramificados de cadena larga (32 carbonos) unidos en cada extremo al glicerol (**Fig. 10–12**). Estas uniones son a través de enlaces éter que son mucho más estables a la hidrólisis a pH bajo y elevada temperatura que los enlaces éster que se encuentran en los lípidos de las bacterias y de los eucariotas. En su forma totalmente extendida, estos lípidos arqueobacterianos tienen una longitud doble de la de los fosfolípidos y esfingolípidos y abarcan todo el grosor de la membrana superficial. A cada extremo de la molécula extendida hay una cabeza polar que consiste en glicerol unido a residuos fosfato o azúcar. El nombre general de estos compuestos, glicerol dialquil glicerol tetraéteres (GDGT) refleja su estructura única y singular. La porción glicerol de los lípidos arqueobacterianos no es el mismo estereoisómero que el de los lípidos de eubacterias y eucariotas; el carbono central se encuentra en la configuración R en las arqueobacterias y en la S en los otros reinos (Fig. 10–8).

Los esfingolípidos son derivados de la esfingosina

Los **esfingolípidos,** la cuarta clase importante de lípidos de membrana, también tienen un grupo de cabeza polar y dos colas apolares pero, a diferencia de los glicerofosfolípidos y galactolípidos, no contienen glicerol. Los esfingolípidos están compuestos por una molécula del aminoalcohol de cadena larga esfingosina (también llamado 4-esfingenina) o uno de sus derivados, una molécula de un ácido graso de cadena larga y un grupo de cabeza polar unido por enlace glucosídico en algunos casos o por enlace fosfodiéster en otros (**Fig. 10–13**).

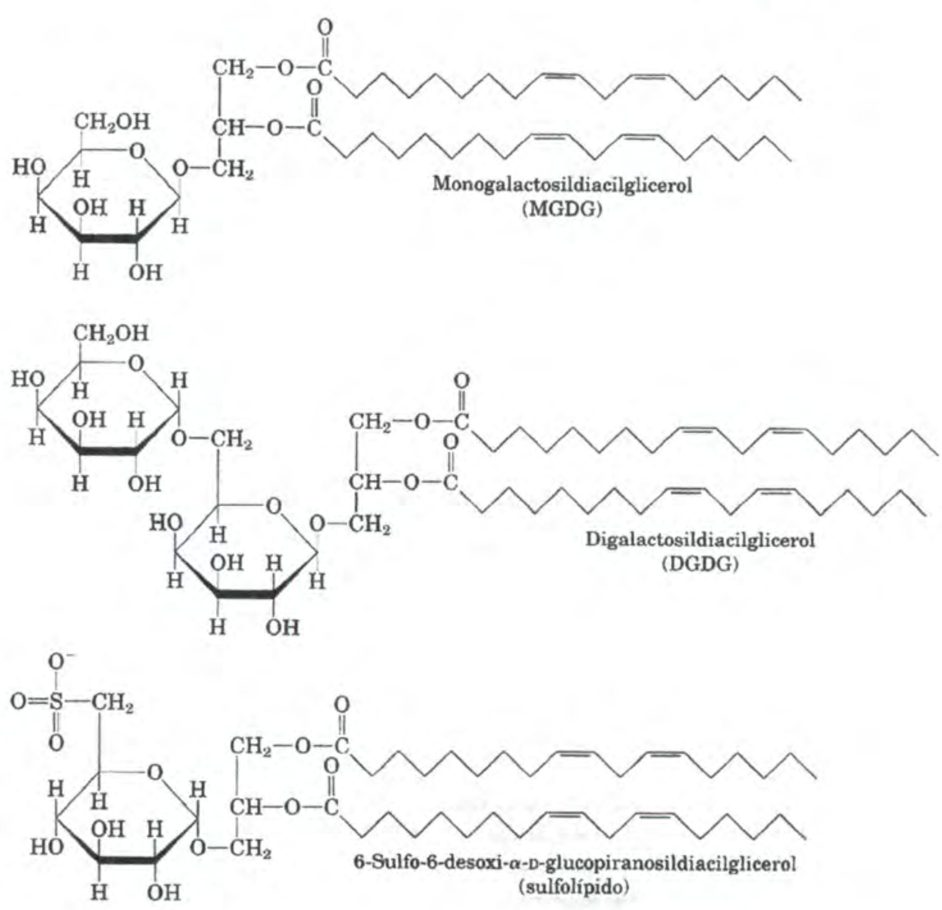


FIGURA 10–11 Tres glucolípidos de las membranas tilacoides de los cloroplastos. En los monogalactosildiacilgliceroles (MGDG) y en los digalactosildiacilgliceroles (DGDG) casi todos los grupos acilo son derivados del ácido linoleico (18:2($\Delta^{9,12}$)) y los grupos de cabeza no tienen carga. En el sulfolípido 6-sulfo-6-desoxi-α-d-glucopiranosildiacilglicerol, el sulfonato es portador de una carga negativa fija.

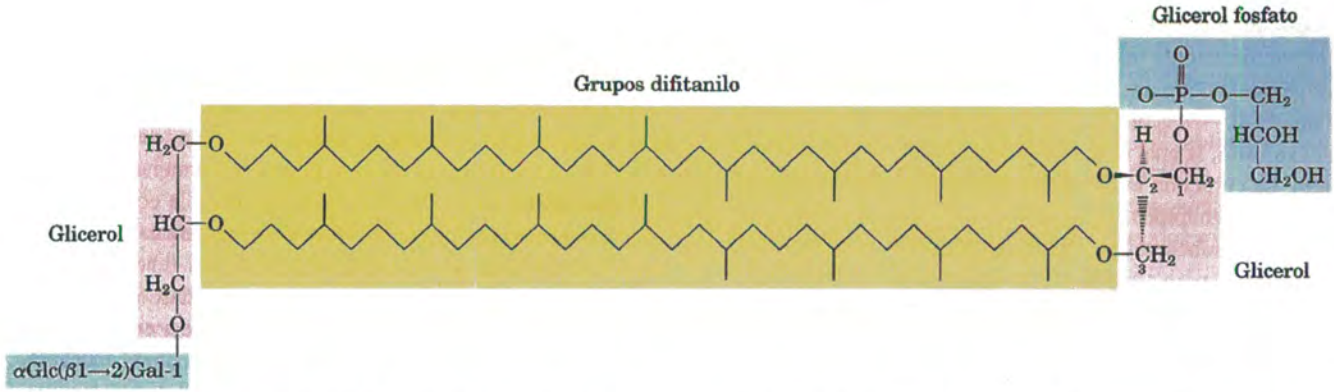
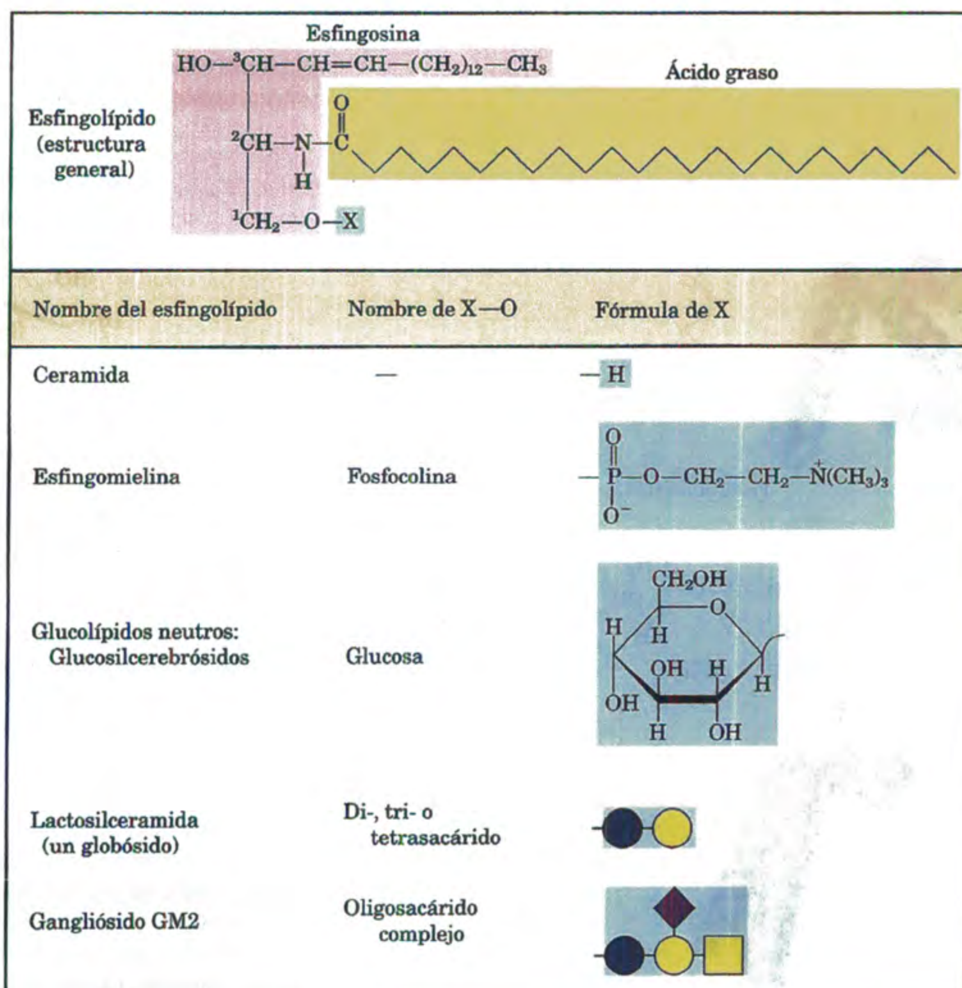


FIGURA 10–12 Lípido de membrana típico de arqueobacteria. En este lípido difitanil tetraéter, las porciones difitanilo (amarillo) son hidrocarburos largos compuestos por ocho grupos isopreno de cinco carbonos condensados cola-cola (sobre la condensación de las unidades de isopreno véase la Figura 21–36; compare también los grupos diftanilo con la cadena lateral de fitol de 20 carbonos presente en las clorofilas mostradas en la Fig. 19–47a). En esta forma extendida, los grupos diftanilo tienen aproximadamente el doble de longitud que un ácido graso de 16 carbonos típico de los lípidos de membrana de las bacterias y eucariotas. Las porciones glicerol de los lípidos arqueobacterianos tienen la configuración R a diferencia de los de bacterias y eucariotas, que tienen la configuración S. Los lípidos de las arqueobacterias difieren en los sustituyentes de los gliceroles. En la molécula aquí mostrada, un glicerol está unido al disacárido α-glucopiranosil-(1→2)-β-galactofuranosa; el otro glicerol está unido a un grupo de cabeza glicerol fosfato.

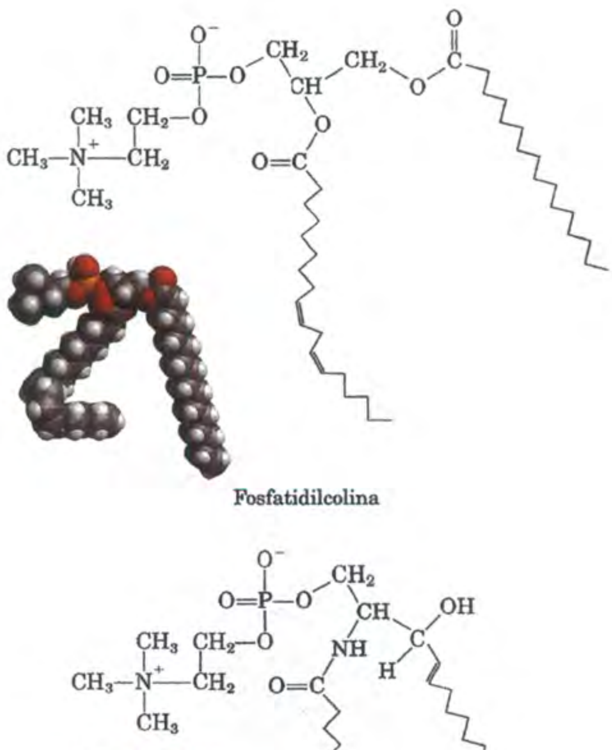


Johann Thudichum, 1829–1901

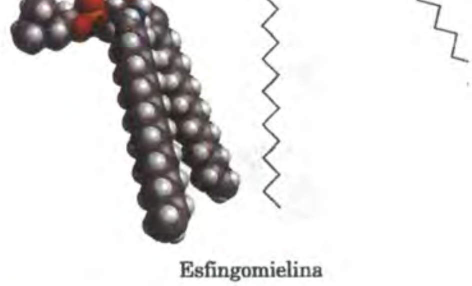
FIGURA 10–13 Esfingolípidos. Los tres primeros carbonos del extremo polar de la esfingosina son análogos a los tres carbonos del glicerol en los glicerofosfolípidos. El grupo amino en C-2 lleva un ácido graso unido por enlace amida. El ácido graso es habitualmente saturado o monoinsaturado y contiene 16, 18, 22 o 24 átomos de carbono. La ceramida es el compuesto de referencia de este grupo. Otros esfingolípidos difieren en el grupo de cabeza polar (X) unido a C-1. Los gangliósidos tienen grupos de cabeza oligosacáridos muy complejos. En esta figura se utilizan las abreviaturas estándar de los glúcidos tal como se muestran en la Tabla 7–1.

Los carbonos C-1, C-2 y C-3 de la molécula de esfingosina son estructuralmente análogos a los tres carbonos del glicerol en los glicerofosfolípidos. Cuando se une un ácido graso por enlace amida al $—NH_2$ del C-2, el compuesto que se obtiene es una **ceramida,** la cual es similar estructuralmente a un diacilglicerol. La ceramida es la unidad estructural fundamental de todos los esfingolípidos.

Hay tres subclases de esfingolípidos, todas ellas derivadas de la ceramida, pero que difieren en sus grupos de cabeza: esfingomielinas, glucolípidos neutros (sin carga) y gangliósidos. Las **esfingomielinas** contienen fosfocolina o fosfoetanolamina como grupo de cabeza polar, por lo que se clasifican como fosfolípidos junto con los glicerofosfolípidos (Fig. 10–7). Las esfingomielinas se parecen, por supuesto, a las fosfatidilcolinas en sus propiedades generales y en su estructura tridimensional y también por no tener carga neta en sus grupos de cabeza polares **(Fig. 10–14)**. Las esfingomielinas se hallan presentes en las membranas plasmáticas de las células animales. Son especialmente abundantes en la mielina, una vaina que rodea y aísla los axones de algunas neuronas; de ahí el nombre "esfingomielinas".



Fosfatidilcolina

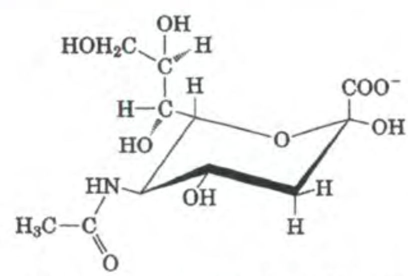


Esfingomielina

FIGURA 10–14 Las similitudes de forma y estructura molecular entre la fosfatidilcolina (glicerofosfolípido) y la esfingomielina (esfingolípido) son evidentes cuando, tal como se hace aquí, se dibujan sus fórmulas estructurales y espaciales.

Los **glucoesfingolípidos,** que se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana plasmática, tienen uno o más azúcares en su grupo de cabeza conectados directamente al —OH en C-1 de la porción ceramida; no contienen fosfato. Los **cerebrósidos** tienen un único azúcar unido a la ceramida; los que contienen galactosa se encuentran de manera característica en las membranas plasmáticas de células del tejido nervioso mientras que las que contienen glucosa se hallan en las membranas plasmáticas de células de tejidos no nerviosos. Los **globósidos** son glucoesfingolípidos con dos o más azúcares, normalmente D-glucosa, D-galactosa o *N*-acetil-D-galactosamina. Dado que no tienen carga a pH 7, los cerebrósidos y los globósidos se denominan a veces **glucolípidos neutros.**

Los **gangliósidos** son los esfingolípidos más complejos. Contienen grupos de cabeza polares formados por oligosacáridos y uno o varios residuos de ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), un ácido siálico (a menudo llamado simplemente "ácido siálico"), terminales. El ácido siálico aporta a los gangliósidos la carga negativa a pH 7 que los distingue de los globósidos. Los gangliósidos con un residuo de ácido siálico forman series GM (*M* de mono-), los que tienen dos ácidos siálicos forman series GD (*D* de di-) y así sucesivamente (GT, tres residuos de ácido siálico; GQ, cuatro).



Ácido *N*-acetil neuramínico (un ácido siálico) (Neu5Ac)

Los esfingolípidos de la superficie celular son sitios de reconocimiento biológico

Cuando hace más de un siglo el físico-químico Johann Thudichum descubrió los esfingolípidos, su papel biológico parecía tan enigmático como la Esfinge, por lo que los bautizó así. En la especie humana, se han identificado al menos 60 esfingolípidos diferentes en las membranas celulares. Muchos de ellos desempeñan un papel especialmente importante en las membranas plasmáticas de neuronas y algunos de ellos constituyen claramente sitios de reconocimiento en la superficie celular pero sólo se ha descubierto la función específica de unos pocos esfingolípidos. La porción glucídica de ciertos esfingolípidos define los grupos sanguíneos humanos y, por tanto, determina el tipo de sangre que los individuos pueden recibir de manera segura en las transfusiones sanguíneas **(Fig. 10–15)**.

Los gangliósidos se concentran en la superficie exterior de las células en donde presentan puntos de reconocimiento para moléculas extracelulares o superficies de células vecinas. Los tipos y cantidades de gangliósidos en la membrana plasmática cambian drásticamente en el desarrollo embrionario. La formación de tumores induce la síntesis de un nuevo complemento

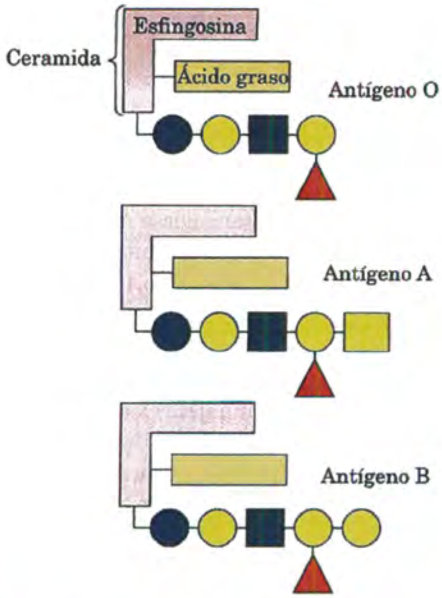


FIGURA 10–15 Los glucoesfingolípidos como determinantes de los grupos sanguíneos. Los grupos sanguíneos humanos (O, A, B) vienen determinados en parte por los grupos de cabeza oligosacáridos de estos glucoesfingolípidos. Los mismos tres oligosacáridos se encuentran también unidos a ciertas proteínas sanguíneas de individuos de los tipos O, A y B, respectivamente. Se utilizan los símbolos estándar para los azúcares (véase la Tabla 7–1).

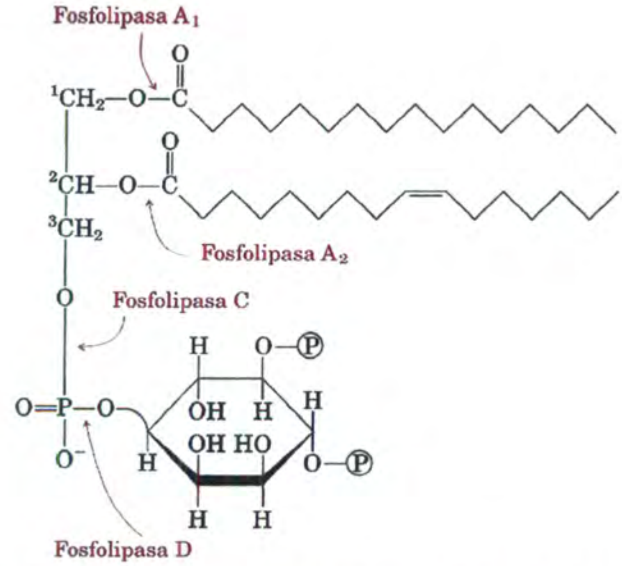


FIGURA 10–16 Especificidad de las fosfolipasas. Las fosfolipasas A_1 y A_2 hidrolizan los enlaces éster de glicerofosfolípidos intactos en C-1 y C-2 del glicerol, respectivamente. Cuando se ha eliminado uno de los ácidos grasos por una fosfolipasa de tipo A, el segundo ácido graso es eliminado de la molécula por una lisofosfolipasa (no se muestra en la figura). Las fosfolipasas C y D rompen cada una de ellas uno de los enlaces fosfodiéster del grupo de cabeza. Algunas fosfolipasas actúan solamente sobre un tipo de glicerofosfolípido, tal como el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (que se muestra aquí) o la fosfatidilcolina; otras son menos específicas.

de los gangliósidos y se ha encontrado que concentraciones muy bajas de un gangliósido específico inducen la diferenciación de células neuronales tumorales en cultivo. El papel biológico de diversos gangliósidos continúa siendo un terreno fecundo para investigaciones futuras.

Los fosfolípidos y los esfingolípidos se degradan en los lisosomas

La mayoría de células degradan y reemplazan continuamente sus lípidos de membrana. Para cada enlace hidrolizable de un glicerofosfolípido existe un enzima hidrolítico específico en los lisosomas **(Fig. 10–16)**. Las fosfolipasas del tipo A eliminan uno de los dos ácidos grasos produciendo un lisofosfolípido. (Estas esterasas no atacan el enlace éter de los plasmalógenos.) Las lisofosfolipasas eliminan el ácido graso restante.

Los gangliósidos se degradan por un conjunto de enzimas lisosómicos que catalizan la eliminación paso a paso de las unidades de azúcar, produciendo finalmente una ceramida. Un defecto genético en cualquiera de estos enzimas hidrolíticos lleva a la acumulación de gangliósidos en la célula, lo cual tiene consecuencias médicas importantes (Recuadro 10–2).

Los esteroles tienen cuatro anillos hidrocarbonados fusionados

Los **esteroles** son lípidos estructurales que se hallan presentes en la membrana de la mayoría de células eucarióticas. La estructura característica de este quinto grupo de lípidos de membrana es la del núcleo esteroide, que consiste en cuatro anillos fusionados, tres de ellos con seis carbonos y uno con cinco **(Fig. 10–17)**. El núcleo esteroide es casi plano y relativamente rígido; los anillos fusionados no permiten la rotación alrede-

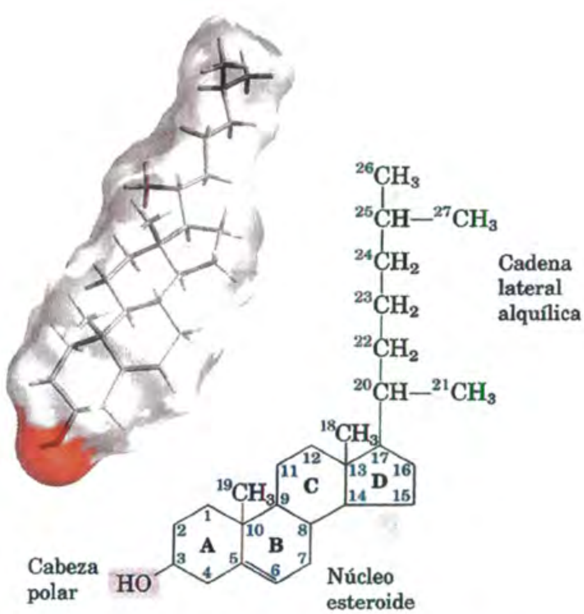


FIGURA 10–17 Colesterol. La estructura en forma de varillas del colesterol es visible mediante un modelo de molécula con contorno superficial transparente. En la estructura química, para simplificar la referencia a los derivados del núcleo esteroide, los anillos se marcan de A a D y los átomos de carbono se numeran en azul. El grupo hidroxilo en C-3 (rosa en ambas representaciones) es el grupo de cabeza polar. Para el almacenamiento y transporte del esterol, este grupo hidroxilo se condensa con un ácido graso formando un éster de esterol.

RECUADRO 10-2 MEDICINA Acumulación anormal de lípidos de membrana: algunas enfermedades genéticas humanas

Los lípidos polares de las membranas experimentan un recambio metabólico constante en el que la velocidad de su síntesis está normalmente contrarrestada por una velocidad de degradación igual. La degradación de los lípidos se consigue mediante enzimas hidrolíticos de los lisosomas con capacidad para hidrolizar un enlace covalente específico cada uno de ellos. Cuando la degradación de esfingolípidos está alterada por un defecto en uno de estos enzimas (Fig. 1), los productos de la degradación parcial se acumulan en los tejidos, causando una enfermedad grave.

Por ejemplo, la enfermedad de Niemann-Pick está causada por un defecto genético raro en el enzima esfingomielinasa, que corta la fosfocolina de la esfingomielina. La esfingomielina se acumula en el cerebro, bazo e hígado. La enfermedad aparece en los lactantes y produce retraso mental y muerte temprana. Mucho más frecuente es la enfermedad de Tay-Sachs (Fig. 2) en la que se acumula el gangliósido GM2 en el cerebro y en el bazo debido a la falta del enzima hexosaminidasa A. Los síntomas de la enfermedad de Tay-Sachs son retraso progresivo del crecimiento, parálisis, ceguera y muerte a los 3 o 4 años de edad.

El consejo genético puede predecir y evitar muchas enfermedades genéticas. Se han diseñado pruebas para detectar enzimas anormales en los futuros padres y, seguidamente, pruebas de DNA pueden determinar la naturaleza exacta del defecto y el riesgo que significa para la descendencia. Una vez producido el embarazo, se pueden hacer pruebas similares sobre células fetales tomando una muestra de una parte de la placenta (biopsia coriónica) o del líquido que rodea el feto (amniocentesis).

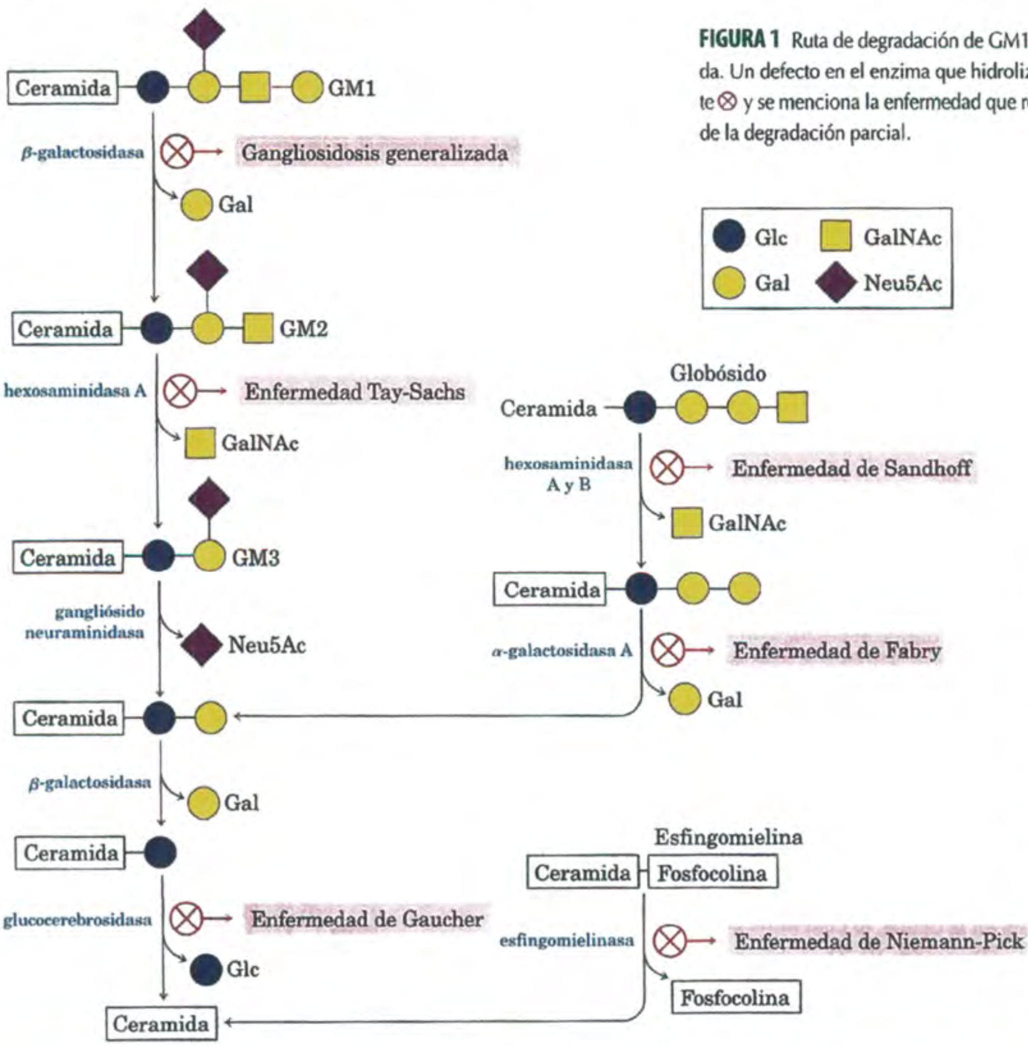


FIGURA 1 Ruta de degradación de GM1, globósido y esfingomielina a ceramida. Un defecto en el enzima que hidroliza un paso concreto se indica mediante ⊗ y se menciona la enfermedad que resulta de la acumulación de productos de la degradación parcial.

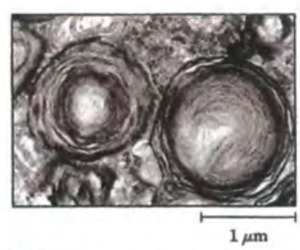
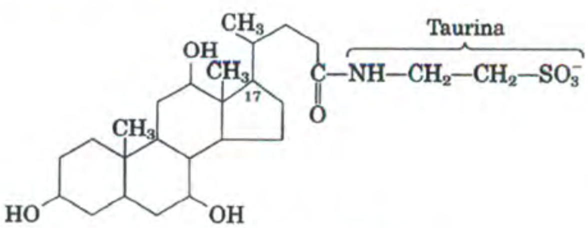


FIGURA 2 Micrografía electrónica de una porción de una célula cerebral de un lactante con la enfermedad de Tay-Sachs, obtenida post mórtem, en la que se muestran los depósitos anormales de gangliósidos en los lisosomas.

dor de los enlaces C-C. El **colesterol** es el principal esterol en los tejidos animales y es anfipático, con un grupo de cabeza polar (el grupo hidroxilo en C-3) y un cuerpo hidrocarbonado apolar (el núcleo esteroide y la cadena lateral hidrocarbonada en C-17) que es casi tan largo como un ácido graso de 16 carbonos en su forma extendida. En otros eucariotas se encuentran esteroles similares: por ejemplo, el estigmasterol en plantas y el ergosterol en hongos. Las bacterias no pueden sintetizar esteroles; unas pocas especies bacterianas, no obstante, pueden incorporar esteroles exógenos en sus membranas. Los esteroles de todos los eucariotas se sintetizan a partir de subunidades sencillas de isopreno de cinco carbonos, lo mismo que las vita-

minas liposolubles, las quinonas y los dolicoles que se describen en la Sección 10.3.

Además de su papel como constituyentes de las membranas, los esteroles son los precursores de diversos productos con actividades biológicas específicas. Las hormonas esteroides, por ejemplo, son potentes señales biológicas que regulan la expresión génica. Los **ácidos biliares** son derivados polares del colesterol que actúan como detergentes en el intestino emulsionando las grasas de la dieta para hacerlas más fácilmente accesibles a las lipasas digestivas.



Ácido taurocólico (un ácido biliar)

Volveremos al colesterol y a otros esteroles en posteriores capítulos para considerar la función estructural del colesterol en las membranas biológicas (Capítulo 11), la señalización por las hormonas esteroides (Capítulo 12) y la notable ruta biosintética del colesterol y su transporte por lipoproteínas transportadoras (Capítulo 21).

RESUMEN 10.2 Lípidos estructurales de las membranas

- Los lípidos polares, que tienen cabezas polares y colas apolares, son componentes principales de las membranas. Los más abundantes son los glicerofosfolípidos que contienen ácidos grasos esterificados con dos grupos hidroxilo del glicerol y un segundo alcohol, el grupo de cabeza, esterificado con el tercer hidroxilo del glicerol a través de un enlace fosfodiéster. Otros lípidos polares son los esteroles.
- Los glicerofosfolípidos se diferencian en la estructura de su grupo de cabeza; la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina son glicerofosfolípidos comunes. Las cabezas polares de los glicerofosfolípidos están cargadas a pH cercano a 7.
- Las membranas de los cloroplastos son ricas en galactolípidos, compuestos por un diacilglicerol con uno o dos residuos de galactosa unidos y en sulfolípidos que son diacilgliceroles con un residuo glucídico sulfonado y, por tanto, con un grupo de cabeza cargado negativamente.
- Las arqueobacterias tienen lípidos de membrana singulares con grupos alquilo de cadena larga unidos por enlace éter con glicerol en ambos extremos y con residuos glucídicos y/o fosfato unidos al glicerol para formar un grupo de cabeza polar o cargado. Estos lípidos son estables en las drásticas condiciones en que viven las arqueobacterias.
- Los esfingolípidos contienen esfingosina, que es un aminoalcohol alifático de cadena larga, pero no glicerol. La esfingomielina tiene, además del ácido fosfórico y la colina, dos cadenas hidrocarbonadas largas, una de ellas aportada por un ácido graso y la otra por la esfingosina. Las otras tres clases de esfingolípidos son los cerebrósidos, los globósidos y los gangliósidos que contienen diversos componentes glucídicos.
- Los esteroles tienen cuatro anillos fusionados y un grupo hidroxilo. El colesterol es el principal esterol en los animales y es, a la vez, un componente estructural de las membranas y un precursor de muchos esteroides.

10.3 Lípidos como señales, cofactores y pigmentos

Las dos clases funcionales de lípidos consideradas hasta el momento (lípidos de almacenamiento y lípidos estructurales) son componentes celulares mayoritarios; los lípidos de las membranas representan del 5 al 10% de la masa seca de muchas células y los lípidos de almacenamiento más del 80% de la masa de un adipocito. Si bien hay algunas excepciones importantes, estos lípidos juegan un papel *pasivo* en la célula; los combustibles lipídicos están almacenados hasta que son oxidados por enzimas y los lípidos de membrana forman barreras impermeables que separan las células y los compartimientos celulares. Hay otro grupo de lípidos que aunque son componentes celulares relativamente minoritarios tienen papeles *activos* en el tráfico metabólico en tanto que metabolitos o mensajeros. Algunos son señales potentes, tales como las hormonas transportadas en la sangre desde un tejido a otro, o como los mensajeros intracelulares generados en respuesta a una señal extracelular (hormona o factor de crecimiento). Otros funcionan como cofactores enzimáticos en reacciones de transferencia de electrones en cloroplastos y mitocondrias o en la transferencia de porciones de azúcar en un gran número de reacciones de glucosilación. Un tercer grupo consiste en lípidos con un sistema de doble enlaces conjugados: moléculas de pigmentos que absorben luz visible. Algunos de éstos actúan como pigmentos que captan la luz en la visión y en la fotosíntesis; otros producen coloraciones naturales tales como el color anaranjado de calabazas y zanahorias o el amarillo de las plumas de canario. Finalmente, un grupo muy extenso de lípidos volátiles producidos en las plantas actúan de señal a través del aire, permitiendo que las plantas se comuniquen entre sí; también son útiles para atraer animales amigos y disuadir enemigos. En esta sección describiremos algunos de estos lípidos biológicamente activos. En capítulos posteriores se considerarán más detalladamente su síntesis y actividades biológicas.

Los fosfatidilinositoles son derivados de la esfingosina que actúan como señales intracelulares

El fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados actúan a varios niveles para la regulación de la estructura y el metabolismo celulares. El fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (Fig. 10–9) en el lado citoplásmico (interior) de las membranas plasmáticas sirve como depósito de moléculas mensajeras que se liberan en el interior de la célula como respuesta a señales extracelulares que interaccionan con receptores específicos de la superficie. Las señales extracelulares, tales como la hormona vasopresina, activan una fosfolipasa C específica en la membrana, la cual hidroliza el fosfa-

tidilinositol-4,5-bisfosfato, liberando dos productos que actúan como mensajeros intracelulares: inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3), que es hidrosoluble, y diacilglicerol, que permanece asociado con la membrana plasmática. El IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático. La combinación del diacilglicerol y del aumento de Ca^{2+} citosólico activa la proteína quinasa C. Mediante la fosforilación de proteínas específicas, este enzima desencadena la respuesta celular a la señal extracelular. Este mecanismo de señalización se describe de manera más detallada en el Capítulo 12 (véase la Fig. 12–10).

Los fosfolípidos de inositol también actúan como puntos de nucleación para algunos complejos supramoleculares que intervienen en la señalización o en la exocitosis. Diversas proteínas de señalización se unen específicamente al fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato en la membrana plasmática, lo que inicia la formación de complejos multienzimáticos en la superficie citosólica de la membrana. La formación del fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato en respuesta a señales extracelulares agrupa las proteínas en complejos de señalización en la superficie de la membrana plasmática (véase la Fig. 12–16).

Los esfingolípidos de membrana actúan también como fuente de mensajeros intracelulares. Tanto las ceramidas como la esfingomielina (Fig. 10–13) son potentes reguladores de las proteína quinasas y se sabe que la ceramida o sus derivados intervienen en la regulación de la división celular, diferenciación, migración y muerte celular programada (también denominada apoptosis; véase el Capítulo 12).

Los icosanoides son portadores de mensajes a las células vecinas

Los icosanoides son hormonas paracrinas, sustancias que actúan sólo en las células próximas al punto de síntesis de la hormona en lugar de ser transportadas por la sangre para actuar en células de otros tejidos u órganos. Estos derivados de ácidos grasos tienen una diversidad de efectos extremadamente potentes sobre varios tejidos de vertebrados. Se sabe que intervienen en la función reproductora; en la inflamación, la fiebre y el dolor asociados a las lesiones o enfermedades; en la formación de coágulos de sangre y en la regulación de la presión sanguínea; en la secreción gástrica ácida, y en diversos procesos importantes en la salud o enfermedad humanas.

Todos los icosanoides proceden del ácido araquidónico, ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos, (20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)) **(Fig. 10–18)**, del que toman su nombre general (del griego *eikosi*, "veinte"). Hay tres clases de icosanoides: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

Las **prostaglandinas** (PG) contienen un anillo de cinco átomos de carbono que originalmente formaba parte de la cadena de ácido araquidónico. Su nombre proviene de la glándula prostática, primer tejido del que fueron aisladas por Bengt Samuelsson y Sune Bergström. Originalmente se definieron dos grupos de prostaglandinas: PGE (de soluble en *é*ter) y PGF (de soluble en tampón *f*osfato). Cada grupo contiene numerosos subtipos, denominados PGE_1, PGE_2, PGF_1, etc. Las prostaglandinas tienen funciones diversas. Algunas prostaglandinas estimulan la contracción del músculo liso del útero durante el parto o en la menstruación. Otras afectan al flujo sanguíneo hacia órganos específicos, al ciclo sueño-vigilia y a la capacidad de respuesta de ciertos tejidos a hormonas tales como la adrenalina y el glucagón. Prostaglandinas de un tercer grupo elevan la temperatura corporal (dando lugar a fiebre) y causan inflamación y dolor.

Los **tromboxanos** tienen un anillo de seis átomos que contiene una función éter. Son producidos por las plaquetas (también llamadas trombocitos) y actúan en la formación de coágulos sanguíneos y en la reducción del flujo sanguíneo hacia el sitio de un coágulo. Los antiinflamatorios no esteroides (NSAID) –aspirina, ibuprofeno y meclofenamato, por ejemplo–, según demostró John Vane, inhiben el enzima prostaglandina H_2 sintasa (también

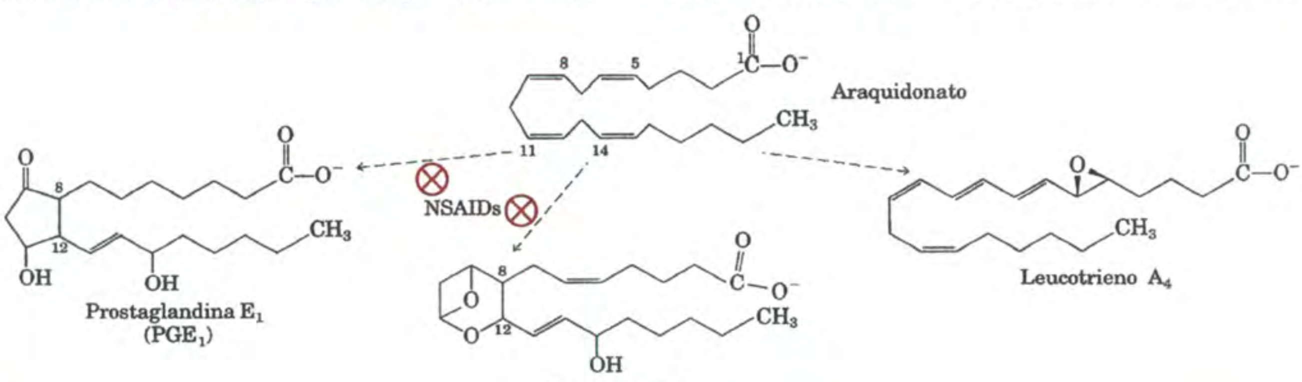


FIGURA 10–18 Ácido araquidónico y algunos de sus derivados icosanoides. El ácido araquidónico (araquidonato a pH 7) es el precursor de icosanoides tales como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. En la prostaglandina PGE_1, el C-8 y el C-12 del araquidonato están unidos formando el característico anillo de cinco átomos. En el tromboxano A_2, el C-8 y el C-12 están unidos y se añade un átomo de oxígeno para formar un anillo hexagonal. El leucotrieno A_4 contiene una serie de tres dobles enlaces conjugados. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAID), tales como la aspirina y el ibuprofeno, bloquean la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir del araquidonato mediante la inhibición del enzima ciclooxigenasa (prostaglandina H_2 sintasa).

John Vane, Sune Bergström y Bengt Samuelsson

llamado ciclooxigenasa o COX), que cataliza uno de los primeros pasos en la ruta del araquidonato a prostaglandinas y tromboxanos (Fig. 10–18; véase también la Figura 21–15).

Los **leucotrienos,** encontrados por primera vez en los leucocitos, contienen tres dobles enlaces conjugados. Son señales biológicas potentes. Por ejemplo, el leucotrieno D_4, derivado del leucotrieno A_4, induce la contracción del músculo liso que recubre las vías aéreas del pulmón. La sobreproducción de leucotrienos produce ataques asmáticos y su síntesis constituye una de las dianas de medicamentos antiasmáticos tales como la prednisona. La fuerte contracción de los músculos lisos del pulmón que tiene lugar en el shock anafiláctico es parte de la reacción alérgica, potencialmente fatal, en individuos hipersensibles a las picadas de abeja, penicilina y a otros agentes. ■

Las hormonas esteroides transportan mensajes entre tejidos

Los esteroides son derivados oxidados de los esteroles; poseen el núcleo del esterol pero carecen de la cadena alquílica unida al anillo D del colesterol y, por ello, son más polares que el colesterol. Las hormonas esteroides se desplazan a través del torrente circulatorio (en proteínas transportadoras) desde el sitio de producción hasta los tejidos diana, donde entran en las células, se unen a proteínas receptoras altamente específicas en el núcleo y provocan cambios en la expresión génica y, por consiguiente, en el metabolismo. Dada la elevadísima afinidad de los receptores hacia la hormona, son suficientes concentraciones muy bajas de hormona (nanomolar o inferior) para producir el efecto sobre los tejidos diana. Los principales grupos de hormonas esteroides son las hormonas sexuales masculinas y femeninas y las hormonas de la corteza suprarrenal, el cortisol y la aldosterona **(Fig. 10–19)**. Prednisona y prednisolona son medicamentos esteroides con potentes actividades antiinflamatorias gracias, en parte, a la inhibición de la liberación del ácido araquidónico por la fosfolipasa A_2 (Fig. 10–18) y la consiguiente inhibición de la síntesis de leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos. Existe una amplia variedad de aplicaciones médicas de estos medicamentos, entre las que se incluye el tratamiento del asma y de la artritis reumatoide. ■

Las plantas vasculares contienen brasinólido, de tipo esteroide (Fig. 10–19), que es un potente regulador del crecimiento al aumentar la velocidad de alargamiento de los tallos y afectar la orientación de las microfibrillas de celulosa de la pared celular durante el crecimiento.

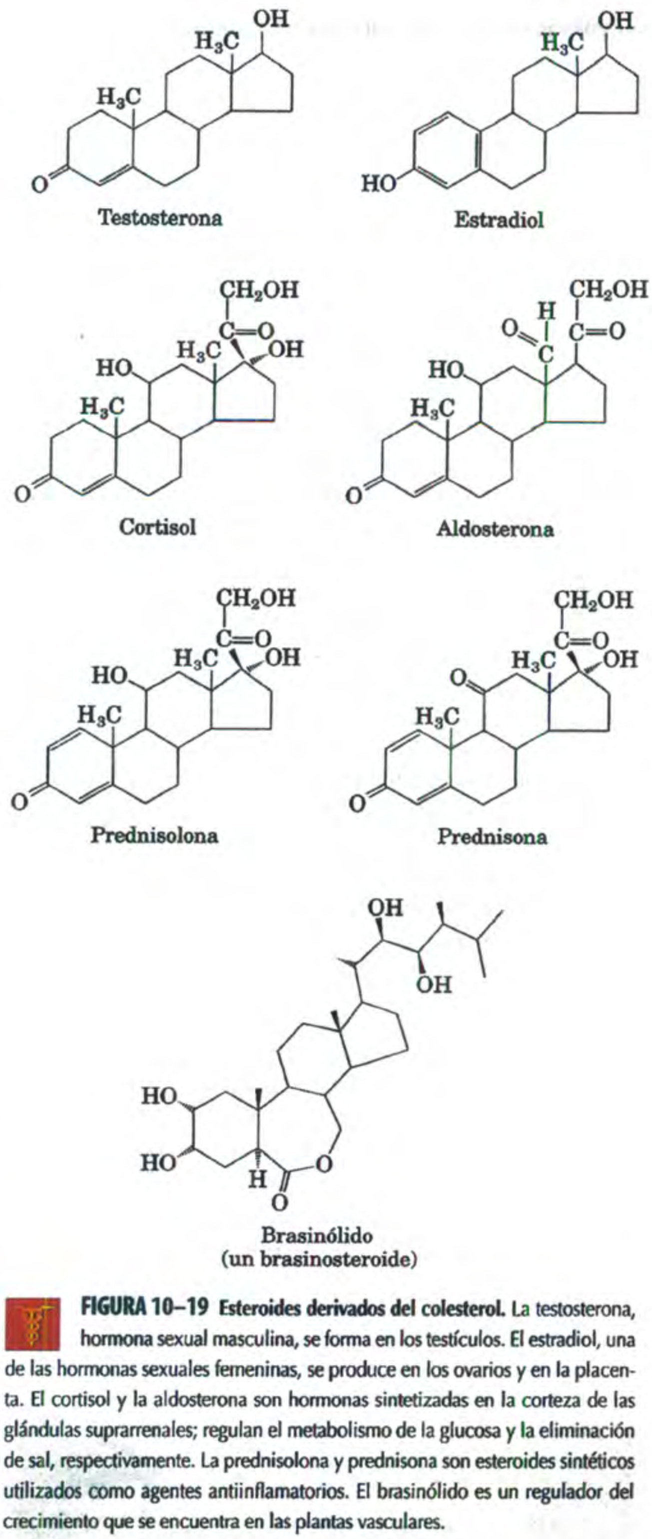


FIGURA 10–19 Esteroides derivados del colesterol. La testosterona, hormona sexual masculina, se forma en los testículos. El estradiol, una de las hormonas sexuales femeninas, se produce en los ovarios y en la placenta. El cortisol y la aldosterona son hormonas sintetizadas en la corteza de las glándulas suprarrenales; regulan el metabolismo de la glucosa y la eliminación de sal, respectivamente. La prednisolona y prednisona son esteroides sintéticos utilizados como agentes antiinflamatorios. El brasinólido es un regulador del crecimiento que se encuentra en las plantas vasculares.

Las plantas vasculares producen millares de señales volátiles

Las plantas producen, literalmente, millares de compuestos lipofílicos diferentes, sustancias volátiles que utilizan para atraer polinadores, repeler herbívoros, atraer organismos que defienden las plantas contra herbívoros y comunicarse con otras plantas. Por ejemplo, el jasmonato, procedente del ácido graso 18:3($\Delta^{9,12,15}$) que se encuentra en los lípidos de las membranas, pone en marcha las defensas de la planta en respuesta a las lesiones causadas por insectos. El éster metílico del jasmonato confiere el aroma característico del aceite de jazmín profusamente utilizado en la industria de perfumería. Gran parte de las sustancias volátiles de las plantas provienen de ácidos grasos o de compuestos formados por la condensación de unidades de isopreno de cinco carbonos; entre ellas se encuentran el geraniol (que da el olor característico de los geranios), el β-pineno (de los pinos), el limoneno (limas), el mentol y la carvona (véase la Fig. 1–23a), por mencionar sólo unos cuantos.

$$CH_2{=}\overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}}{-}CH{=}CH_2$$

Isopreno

Las vitaminas A y D son precursores hormonales

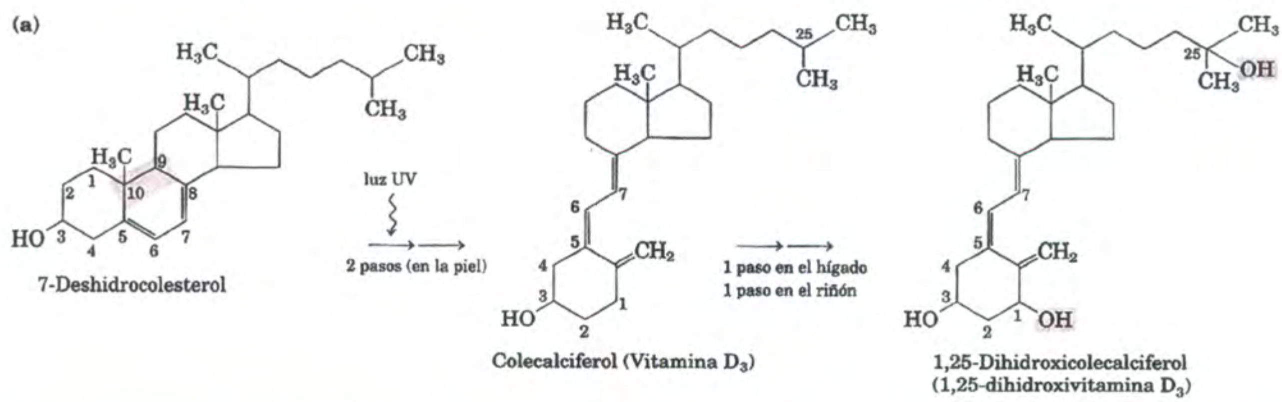
Durante el primer tercio del siglo XX un foco importante de investigación en la química fisiológica fue la identificación de las **vitaminas**, compuestos esenciales para la salud del ser humano y otros vertebrados que no pueden ser sintetizados por estos animales, motivo por el cual deben ser obtenidos de la dieta. En los primeros estudios nutricionales se identificaron dos clases generales de este tipo de compuestos: los que eran solubles en disolventes orgánicos apolares (vitaminas liposolubles) y los que se podían extraer de los alimentos con disolventes acuosos (vitaminas hidrosolubles). En último término, el grupo liposoluble se resolvió en los cuatro grupos de vitaminas A, D, E y K, todas ellas compuestos isoprenoides sintetizados por condensación de múltiples unidades de isopreno. Dos de estos grupos (D y A) son precursores hormonales.

La **vitamina D_3,** también llamada **colecalciferol,** se forma normalmente en la piel a partir de 7-deshidrocolesterol mediante una reacción fotoquímica accionada por el componente ultravioleta de la luz solar **(Fig. 10–20a)**. La vitamina D_3, por sí misma, no es biológicamente activa pero enzimas del hígado y los riñones convierten este precursor en el 1,25-dihidroxicolecalciferol, hormona que regula la captación de calcio en el intestino y las concentraciones del calcio en el riñón y en los huesos. La deficiencia de vitamina D conduce a la formación defectuosa de los huesos propia de la enfermedad del raquitismo, que se cura de forma espectacular con la administración de vitamina D (Fig. 10–20b). La vitamina D_2 (ergocalciferol) es un producto comercial formado por la irradiación UV del ergosterol de la levadura. La vitamina D_2 es similar estructuralmente a la D_3, con una pequeña modificación en la cadena lateral que se une al anillo D del esterol. Ambas tienen los mismos efectos biológicos. La vitamina D_2 se añade habitualmente a la leche y a la mantequilla como suplemento dietético. Al igual que con las hormonas esteroides, el producto del metabolismo de la vitamina D, el 1,25-dihidroxicolecalciferol, regula la expresión génica al interaccionar con proteínas receptores nucleares específicas.

La **vitamina A (retinol)** en sus distintas formas funciona como una hormona y como pigmento visual de los ojos de los vertebrados **(Fig. 10–21)**. Actuando a través de proteínas receptoras en el núcleo celular el ácido retinoico, derivado de la vitamina A, regula la expresión génica en el desarrollo del tejido epitelial, la piel incluida. El ácido retinoico es el principio activo en el medicamento tretinoin (Retin-A), utilizado en el tratamiento de los acnés graves y pieles arrugadas. El retinal, otro derivado de la vitamina A, es el pigmento que inicia la respuesta a la luz de los bastones y conos de la retina, produciendo una señal neuronal hacia el cerebro. Este papel del retinal se describe con detalle en el Capítulo 12.

La vitamina A fue aislada por primera vez a partir de aceites de hígado de pescados; el hígado, los huevos, la leche entera y la mantequilla son buenas fuentes de la dieta. En vertebrados, el β-caroteno, pigmento que confiere a las zanahorias, boniatos y otros vegetales amarillos su color característico, se puede convertir enzimáticamente en vitamina A. La deficiencia de vitamina A produce diversos síntomas en la especie humana, entre los que se cuentan la sequedad de la piel, de los ojos y de las membranas mucosas, así como desarrollo y crecimiento retardados y ceguera nocturna, siendo esta última un síntoma

(a)



(b)

FIGURA 10–20 Producción y metabolismo de la vitamina D_3. **(a)** El colecalciferol (vitamina D_3) se produce en la piel por irradiación UV del 7-deshidrocolesterol, que rompe el enlace sombreado en rosa. En el hígado se añade un grupo hidroxilo en C-25; en el riñón, una segunda hidroxilación en C-1 produce la hormona activa, 1,25-dihidroxicolecalciferol. Esta hormona regula el metabolismo del Ca^{2+} en riñones, intestino y huesos. **(b)** La vitamina D de la dieta evita el raquitismo, enfermedad que fue común en climas fríos en los que la ropa de abrigo abundante bloqueaba el componente UV de la luz solar necesario para la producción de vitamina D_3 por la piel. En este detalle, parte de un gran mural, obra de John Steuart Curry, *The Social Benefits of Biochemical Research* (1943), las personas y los animales a la izquierda muestran los efectos de la nutrición deficiente entre las que se observan las piernas arqueadas de un niño con raquitismo clásico. A la derecha se encuentran personas y animales más sanos gracias a "los beneficios sociales de la investigación", entre los que se incluyen la utilización de la vitamina D para la prevención y el tratamiento del raquitismo. Este mural se encuentra en el Department of Biochemistry de la University of Wisconsin-Madison.

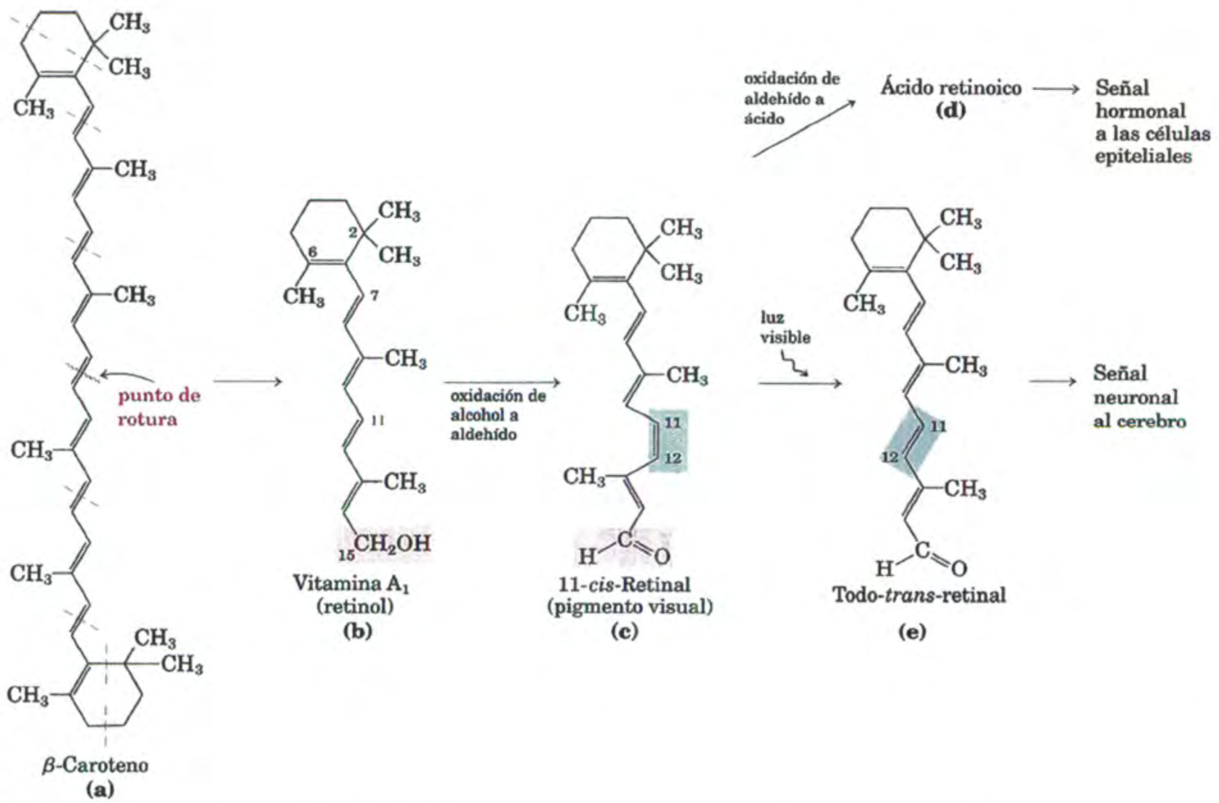


FIGURA 10–21 Vitamina A_1, sus precursores y derivados. **(a)** El β-caroteno es el precursor de la vitamina A_1. Se resaltan las unidades estructurales de isopreno mediante líneas de trazos rojas (véase la p. 359). La rotura del β-caroteno produce dos moléculas de vitamina A_1 (retinol). **(b)** La oxidación en C-15 convierte el retinol en su aldehído retinal **(c)**, y la posterior oxidación produce ácido retinoico **(d)**, una hormona que regula la expresión génica. La rodopsina (no mostrada), pigmento visual muy utilizado en la naturaleza, está formada por la combinación del retinal con la proteína opsina. En la oscuridad, el retinal de la rodopsina se encuentra en la forma 11-*cis* **(c)**. Cuando se excita una molécula de rodopsina con luz visible, el 11-*cis*-retinal experimenta una serie de reacciones fotoquímicas que lo convierten en todo-*trans*-retinal **(e)** forzando un cambio en la forma de la molécula completa de rodopsina. Esta transformación en los bastones de la retina de los vertebrados envía una señal eléctrica hacia el cerebro que es la base de la transducción visual, tema que se trata con más detalle en el Capítulo 12.

temprano utilizado frecuentemente en el diagnóstico clínico de la deficiencia de vitamina A. ■

Las vitaminas E y K y las quinonas lipídicas son cofactores de oxidación-reducción

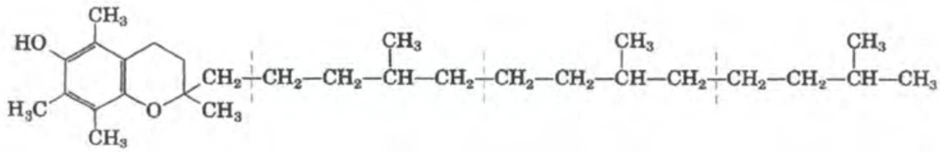
La **vitamina E** es el nombre colectivo de un grupo de lípidos estrechamente relacionados denominados **tocoferoles** que contienen un anillo aromático sustituido y una cadena lateral isoprenoide larga **(Fig. 10–22a)**. Dado que son hidrofóbicos, los tocoferoles se asocian con las membranas celulares, los depósitos lipídicos y las lipoproteínas de la sangre. Los tocoferoles son antioxidantes biológicos. El anillo aromático reacciona con las formas más reactivas de radicales del oxígeno y otros radicales libres destruyéndolas. De este modo, se protege de la oxidación a los ácidos grasos insaturados y se previenen las lesiones oxidativas de los lípidos de las membranas, lo cual puede causar fragilidad celular. Los tocoferoles se encuentran en los huevos y aceites vegetales, siendo especialmente abundantes en el germen de trigo. En animales de laboratorio sometidos a dietas carentes de vitamina E aparece piel escamosa, debilidad muscular, pérdida de peso y esterilidad. La deficiencia de vitamina E en seres humanos es muy rara; el principal síntoma es la fragilidad de los eritrocitos.

El anillo aromático de la **vitamina K** (Fig. 10–22b) experimenta un ciclo de oxidación y reducción durante la formación de la protrombina activa, una proteína del plasma sanguíneo esencial para la formación del coágulo sanguíneo. La protrombina es un enzima proteolítico que rompe enlaces peptídicos de la proteína sanguínea fibrinógeno, convirtiéndola en fibrina, la proteína fibrosa insoluble que mantiene unidos los coágulos de sangre. Henrik Dam y Edward A. Doisy descubrieron de forma independiente que la deficiencia de vitamina K da lugar a una coagulación de la sangre más lenta que puede ser fatal. La deficiencia de vitamina K es muy rara en humanos, aparte de un pequeño porcentaje de lactantes que padecen la enfermedad hemorrágica del recién nacido, un trastorno potencialmente fatal. En Estados Unidos, los recién nacidos reciben rutinaria-

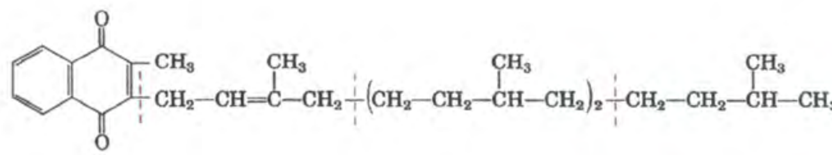
Edward A. Doisy, 1893–1986

Henrik Dam, 1895–1976

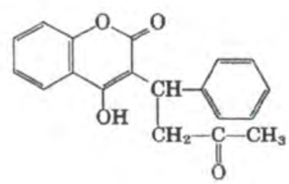
(a)
Vitamina E: un antioxidante



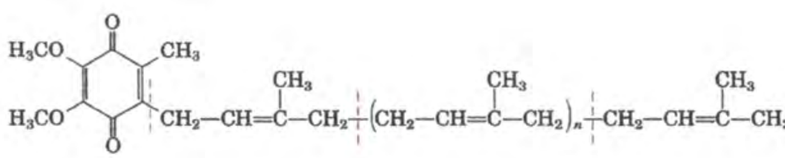
(b)
Vitamina K_1: un cofactor de la coagulación sanguínea (filoquinona)



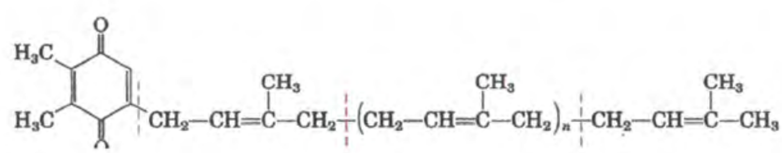
(c)
Warfarina: un anticoagulante sanguíneo



(d)
Ubiquinona: un transportador de electrones en las mitocondrias (coenzima Q) (n = 4-8)



(e)
Plastoquinona: un transportador de electrones en los cloroplastos (n = 4-8)



(f)
Dolicol: un transportador glucídico (n = 9-22)

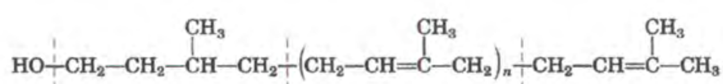


FIGURA 10–22 Otros compuestos isoprenoides, o derivados, biológicamente activos. Las unidades procedentes del isopreno se hallan marcadas por líneas de trazos rojas. En la mayoría de los tejidos de los mamíferos, la ubiquinona (también llamada coenzima Q) tiene diez unidades de isopreno. Los dolicoles de animales tienen entre 17 y 21 unidades de isopreno (de 85 a 105 átomos de carbono), los dolicoles de bacterias tienen 11 y los de plantas y hongos tienen entre 14 y 24.

mente una inyección de 1 mg de vitamina K. La vitamina K_1 (filoquinona) se encuentra en las hojas de las plantas verdes mientras que una forma relacionada, la vitamina K_2 (menaquinona) es sintetizada por las bacterias que residen en el intestino de los vertebrados.

La warfarina (Fig. 10–22c) es un compuesto sintético que inhibe la formación de protrombina activa. Es muy venenoso para las ratas a las que les produce la muerte por hemorragia interna. Curiosamente, este potente rodenticida es también un valioso medicamento anticoagulante para el tratamiento de los pacientes con riesgo de coagulación excesiva de la sangre, tales como los pacientes operados y los que sufren trombosis coronaria. ■

La ubiquinona (también llamada coenzima Q) y la plastoquinona (Fig. 10–22d, e) son isoprenoides que funcionan como transportadores de electrones lipofílicos en las reacciones de oxidación-reducción que impulsan la síntesis de ATP en la mitocondria y en los cloroplastos, respectivamente. Tanto la ubiquinona como la plastoquinona pueden aceptar bien uno bien dos electrones al tiempo que uno o dos protones (véase la Fig. 19–2).

Los dolicoles activan precursores glucídicos para la biosíntesis

Durante la formación de los glúcidos complejos de las paredes celulares bacterianas así como en la adición de unidades polisacáridas a ciertas proteínas (glucoproteínas) y lípidos (glucolípidos) en eucariotas, las unidades glucídicas que se han de adicionar están activadas químicamente mediante unión a alcoholes isoprenoides denominados **dolicoles** (Fig. 10–22f). Estos compuestos tienen interacciones hidrofóbicas fuertes con los lípidos de membrana, anclando los glúcidos unidos a la membrana en donde participan en reacciones de transferencia de glúcidos.

Muchos pigmentos naturales son dienos conjugados lipídicos

Los dienos conjugados tienen cadenas carbonadas en las que se alternan enlaces dobles y sencillos. Debido a que este ordenamiento estructural permite la deslocalización de electrones, los compuestos se pueden excitar mediante radiación electromag-

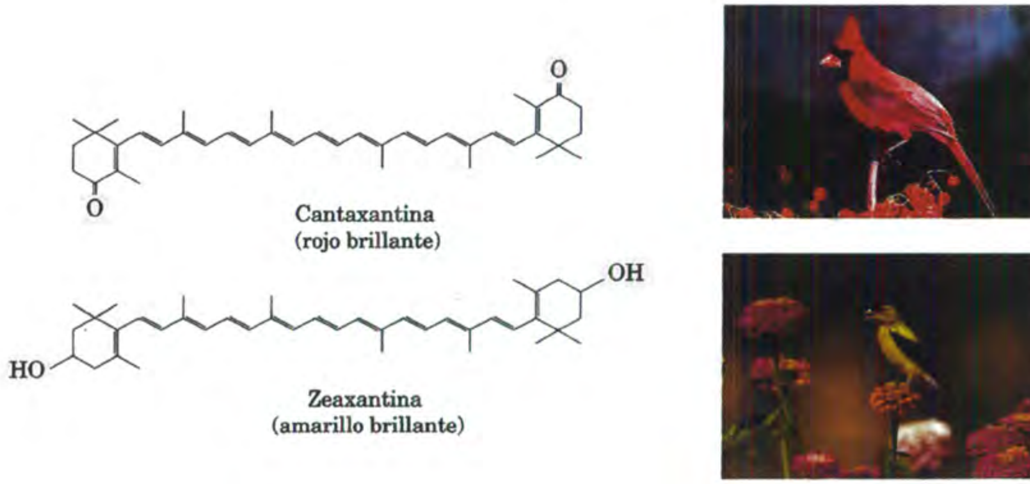


FIGURA 10–23 Los lípidos como pigmentos en plantas y en las plumas de las aves. Los compuestos que contienen largos sistemas conjugados absorben luz de la región visible del espectro. Diferencias sutiles en la química de estos compuestos producen pigmentos de colores sorprendentemente diferentes. Las aves adquieren los pigmentos que colorean sus plumas de rojo o amarillo al ingerir materiales vegetales que contienen pigmentos carotenoides tales como la cantaxantina y la zeaxantina. Las diferencias de pigmentación entre aves machos y hembras son el resultado de diferencias en la captación intestinal y en la modificación de los carotenoides.

nética de baja energía (luz visible), confiriéndoles coloración visible tanto para los ojos humanos como para los de otros animales. El caroteno (Fig. 10–21) es amarillo anaranjado; compuestos parecidos son responsables de los llamativos colores rojo, naranja o amarillo de las plumas de las aves (**Fig. 10–23**). Lo mismo que los esteroles, esteroides, dolicoles, vitaminas A, E, D y K, ubiquinona y plastoquinona, estos pigmentos se sintetizan a partir de derivados del isopreno de cinco carbonos; la ruta biosintética se describe detalladamente en el Capítulo 21.

RESUMEN 10.3 Lípidos como señales, cofactores y pigmentos

- Algunos tipos de lípidos, aunque presentes en cantidades relativamente pequeñas, tienen papeles esenciales como cofactores o señales.
- El fosfatidilinositol bisfosfato es hidrolizado dando dos mensajeros intracelulares, el diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trisfosfato. El fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato constituye un punto de nucleación para los complejos proteicos supramoleculares que actúan en la señalización biológica.
- Las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos (los icosanoides), procedentes del araquidonato, son hormonas extremadamente potentes.
- Las hormonas esteroides provienen de los esteroles y actúan como señales biológicas potentes como, por ejemplo, las hormonas sexuales.
- Las vitaminas A, D, E y K son compuestos liposolubles formados por unidades de isopreno. Todas tienen papeles esenciales en el metabolismo o la fisiología de los animales. La vitamina D es el precursor de una hormona que regula el metabolismo del calcio. La vitamina A proporciona el pigmento visual del ojo de los vertebrados y actúa como regulador de la expresión génica durante el crecimiento de las células epiteliales. La vitamina E actúa en la protección de los lípidos de membrana frente a la lesión oxidativa y la vitamina K es esencial en el proceso de coagulación de la sangre.
- Las ubiquinonas y plastoquinonas también son derivados isoprenoides que actúan como transportadores de electrones en las mitocondrias y cloroplastos, respectivamente.
- Los dolicoles activan y anclan sobre membranas celulares glúcidos utilizados en la síntesis de glúcidos complejos, glucolípidos y glucoproteínas.
- Los pigmentos de las flores y frutos y las que dan sus colores llamativos a las plumas de las aves son dienos conjugados lipídicos.

10.4 Trabajar con lípidos

Debido a que los lípidos son insolubles en agua, su extracción y el posterior fraccionamiento requieren la utilización de disolventes orgánicos y algunas técnicas poco usadas en la purificación de moléculas hidrosolubles tales como las proteínas y los glúcidos. En general, las mezclas complejas de lípidos se separan por las diferencias en la polaridad o solubilidad en disolventes apolares. Los lípidos que contienen ácidos grasos en enlace éster o amida se pueden hidrolizar tratándolos con un ácido o un álcali o con enzimas hidrolíticos específicos (fosfolipasas, glucosidasas) para analizar sus componentes. Algunos métodos comúnmente utilizados para el análisis de lípidos se muestran en la **Figura 10–24** y se estudian a continuación.

La extracción de lípidos requiere la utilización de disolvente orgánico

Los lípidos neutros (triacilgliceroles, ceras, pigmentos, etc.) se extraen fácilmente de los tejidos con éter etílico, cloroformo o benceno, disolventes en los que no se produce la agregación de lípidos promovida por las interacciones hidrofóbicas. Los lípi-

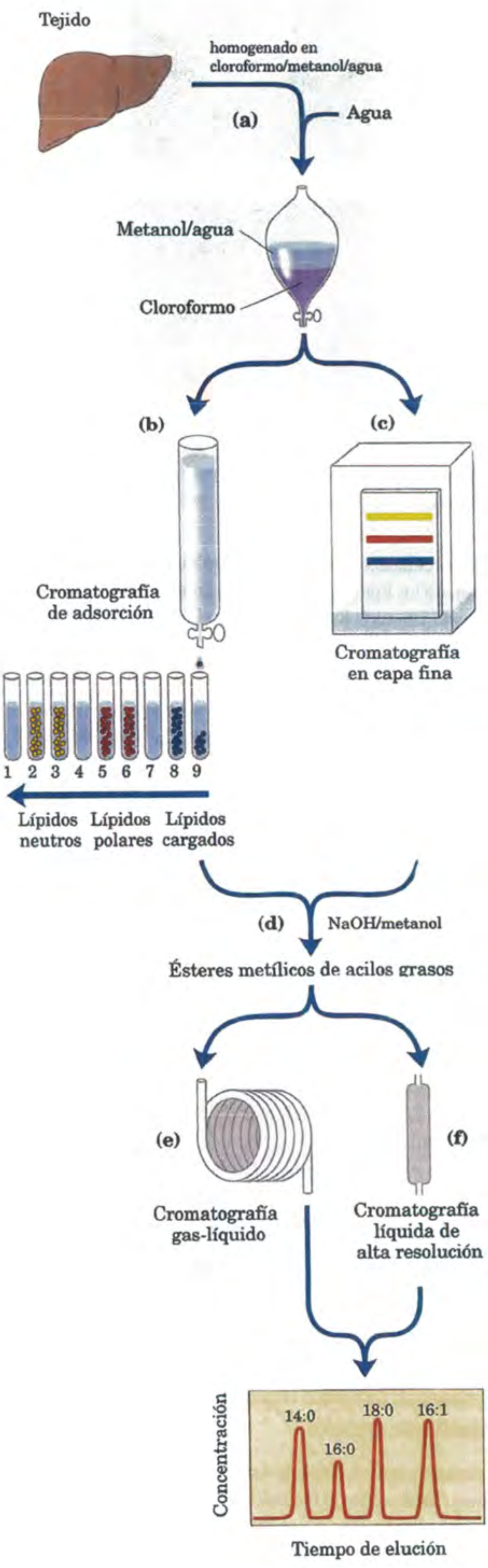


FIGURA 10–24 Procedimientos comunes utilizados en la extracción, separación e identificación de lípidos celulares. **(a)** Se homogeniza el tejido en una mezcla cloroformo/metanol/agua, la cual al añadir más agua y eliminar el sedimento no extraíble por centrifugación proporciona dos fases. Se pueden extraer diversos lípidos de la fase cloroformo mediante **(b)** cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice a través de la que se hacen pasar disolventes de polaridad creciente o **(c)** cromatografía en capa fina (TLC) en la que los lípidos son arrastrados sobre una placa recubierta con gel de sílice por un frente de disolvente ascendente. Los lípidos menos polares se desplazan más rápidamente que los lípidos más polares o los que están cargados. La TLC con los disolventes adecuados también puede servir para separar especies lipídicas individuales muy semejantes; por ejemplo, los lípidos cargados fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol se separan fácilmente en TLC.

Para la determinación de la composición de ácidos grasos, una fracción lipídica que contiene ácidos grasos unidos por enlace éster se transesterifica en una solución acuosa templada de NaOH y metanol **(d)** produciéndose una mezcla de ésteres metílicos de acilos grasos. Estos ésteres metílicos se separan en función de la longitud de cadena y grado de saturación por **(e)** cromatografía gas-líquido (GLC) o por **(f)** cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La determinación precisa de la masa molecular por espectrometría de masas permite la identificación sin ambigüedades de los lípidos individuales.

dos de membrana se extraen mejor con disolventes orgánicos más polares, tales como etanol o metanol, que reducen las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de lípidos pero que también debilitan los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas que unen los lípidos de membrana a las proteínas de membrana. Una solución extractiva muy utilizada es una mezcla de cloroformo, metanol y agua, inicialmente en proporciones que sean miscibles produciendo una sola fase (1:2:0,8). Después de homogeneizar el tejido en este disolvente para extraer todos los lípidos, se añade más agua al extracto resultante, que se separa en dos fases, metanol/agua (fase superior) y cloroformo (fase inferior). Los lípidos permanecen en el cloroformo, y las moléculas más polares tales como proteínas y glúcidos se sitúan en la fase polar de metanol/agua.

La cromatografía de adsorción separa los lípidos de polaridad diferente

Las mezclas complejas de lípidos tisulares se pueden fraccionar mediante procedimientos cromatográficos basados en la diferente polaridad de cada clase de lípido. En la cromatografía de adsorción (Fig. 10–24b), se empaqueta un material polar insoluble, tal como el gel de sílice (una forma de ácido silícico, $Si(OH)_4$), en una columna de vidrio aplicándose la mezcla de lípidos (en solución de cloroformo) en la parte superior de la columna. (En cromatografía líquida de alta resolución, la columna tiene un diámetro menor y los disolventes se fuerzan a pasar a través de la columna a altas presiones.) Los lípidos polares se fijan fuertemente al ácido silícico polar mientras que los lípidos neutros pasan directamente a través de la columna y emergen en el primer lavado con cloroformo. A continuación se eluyen los lípidos polares, en orden de polaridad creciente, lavando la columna progresivamente con disolventes de mayor polaridad. Los lípidos polares sin carga (cerebrósidos, por ejemplo) se eluyen con acetona y los lípidos muy polares o cargados (tales como los glicerofosfolípidos) se eluyen con metanol.

La cromatografía en capa fina sobre ácido silícico utiliza el mismo principio (Fig. 10–24c). Se distribuye una fina capa de gel de sílice sobre una placa de vidrio a la que se adhiere. Se aplica una pequeña muestra de lípidos disueltos en cloroformo cerca del borde de la placa, la cual se sumerge en un recipiente poco profundo con un disolvente orgánico, o una mezcla de disolventes, contenidos dentro de una cámara cerrada saturada con vapor del disolvente. A medida que el disolvente asciende sobre la placa por acción de la capilaridad arrastra consigo los lípidos. Los lípidos menos polares son los que se desplazan más rápidamente ya que tienen menos tendencia a unirse al ácido silícico. Después de su separación se pueden detectar los lípidos pulverizando sobre la placa con un colorante (rodamina) que presenta fluorescencia cuando se asocia con lípidos o bien exponiendo la placa a los vapores de yodo. El yodo reacciona reversiblemente con los dobles enlaces de los ácidos grasos confiriendo a los lípidos que los contengan un color amarillo o marrón. Existe una gran variedad de reactivos que se pulverizan y que son también útiles en la detección de lípidos específicos. Para el análisis posterior, se pueden rascar de la placa las regiones que contienen los lípidos separados recuperándolos por extracción con un disolvente orgánico.

La cromatografía gas-líquido separa las mezclas de derivados lipídicos volátiles

La cromatografía gas-líquido separa los componentes volátiles de una mezcla según sus tendencias relativas a disolverse en el material inerte empaquetado en la columna cromatográfica y a volatilizarse desplazándose a través de la columna arrastrados por una corriente de un gas inerte tal como el helio. Algunos lípidos son de naturaleza volátil pero la mayoría han de modificarse previamente para aumentar su volatilidad (esto es, disminuir su punto de ebullición). Para el análisis de los ácidos grasos presentes en una muestra de fosfolípidos, se someten primeramente a transesterificación: se calientan en una mezcla metanol/HCl o metanol/NaOH, que convierte los ácidos grasos que esterificaban al glicerol en sus ésteres metílicos (Fig. 10–24d). Se aplican a continuación estos ésteres metílicos de los acilos grasos en una columna de cromatografía gas-líquido y ésta se calienta para volatilizar los compuestos. Aquellos ésteres de acilo graso más solubles en el material de la columna se reparten (disuelven) en el mismo; los menos solubles son arrastrados por la corriente de gas inerte y emergen en primer lugar de la columna. El orden de elución depende de la naturaleza del adsorbente sólido de la columna y del punto de ebullición de los componentes de la mezcla lipídica. Con la utilización de estas técnicas se pueden separar completamente mezclas de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena y diversos grados de insaturación (Fig. 10–24e).

La hidrólisis específica ayuda a determinar la estructura lipídica

Ciertas clases de lípidos son susceptibles de degradación en condiciones específicas. Por ejemplo, todos los ácidos grasos unidos por enlace éster en los triacilgliceroles, fosfolípidos y ésteres de esteroles se liberan mediante tratamiento ácido o alcalino suave mientras que un tratamiento algo más fuerte libera los ácidos grasos unidos por enlace amida de los esfingolípidos. Los enzimas que hidrolizan específicamente ciertos lípidos también son útiles en la determinación de la estructura lipídica. Las fosfolipasas A, C y D (Fig. 10–16) hidrolizan enlaces específicos en los fosfolípidos dando productos de solubilidad y comportamiento cromatográfico característicos. La fosfolipasa C, por ejemplo, libera un fosforil alcohol hidrosoluble (tal como la fosfocolina en la fosfatidilcolina) y un diacilglicerol soluble en cloroformo, cada uno de los cuales se puede caracterizar separadamente para determinar la estructura del fosfolípido intacto. La combinación de hidrólisis específica con caracterización de los productos por cromatografía en capa fina, cromatografía gas-líquido o cromatografía líquida de alta resolución a menudo permite la determinación de la estructura de un lípido.

La espectrometría de masas revela la estructura lipídica completa

Para establecer sin ambigüedades la longitud de una cadena hidrocarbonada o la posición de los dobles enlaces, es de gran valor el análisis por espectrometría de masas de los lípidos o de sus derivados volátiles. Las propiedades químicas de lípidos similares (por ejemplo, dos ácidos grasos de longitud similar insaturados en posiciones diferentes o dos isoprenoides con un número diferente de unidades isopreno) son muy parecidas y a menudo la posición de elución utilizando varios métodos cromatográficos no los distingue entre sí. Sin embargo, cuando se acopla un espectrómetro de masas a la salida de una columna cromatográfica, los componentes de la mezcla lipídica pueden ser separados e identificados simultáneamente por su patrón de fragmentación característico (**Fig. 10–25**).

La lipidómica pretende catalogar todos los lípidos y sus funciones

Cuando se explora el papel biológico de los lípidos en las células y tejidos es importante saber qué lípidos y en qué proporciones están presentes y saber de qué modo esta composición lipídica cambia con el desarrollo embrionario, la enfermedad o el tratamiento con fármacos. Cuando los bioquímicos que estudian los lípidos han sido conscientes de los millares de lípidos presentes en la naturaleza, han propuesto un nuevo sistema de nomenclatura con el fin de que sea más fácil compilar y explorar bases de datos sobre la composición en lípidos. El sistema sitúa cada lípido en uno de ocho grupos químicos (Tabla 10–3) designado con dos letras. Dentro de estos grupos se hacen distinciones más finas mediante clases y subclases numeradas. Por ejemplo, todas las glicerofosfocolinas pertenecen a GP01; el subgrupo de las glicerofosfocolinas con dos ácidos grasos en enlace éster se designa GP0101, y con un ácido graso unido por enlace éter en la posición 1 y un enlace éster en la posición 2 constituye GP0102. Los ácidos grasos específicos se designan con números que proporcionan a cada lípido su propio identificador único, de modo que cada lípido concreto, incluidos tipos de lípidos aún no descubiertos, se puede describir sin ambigüedad en términos de un identificador de 12 caracteres. Un factor utilizado en esta clasificación es la naturaleza del precursor biosintético. Por ejemplo, los lípidos prenólicos (dolicoles y vitaminas E y K, por ejemplo) se forman a partir de precursores isoprenilo. En-

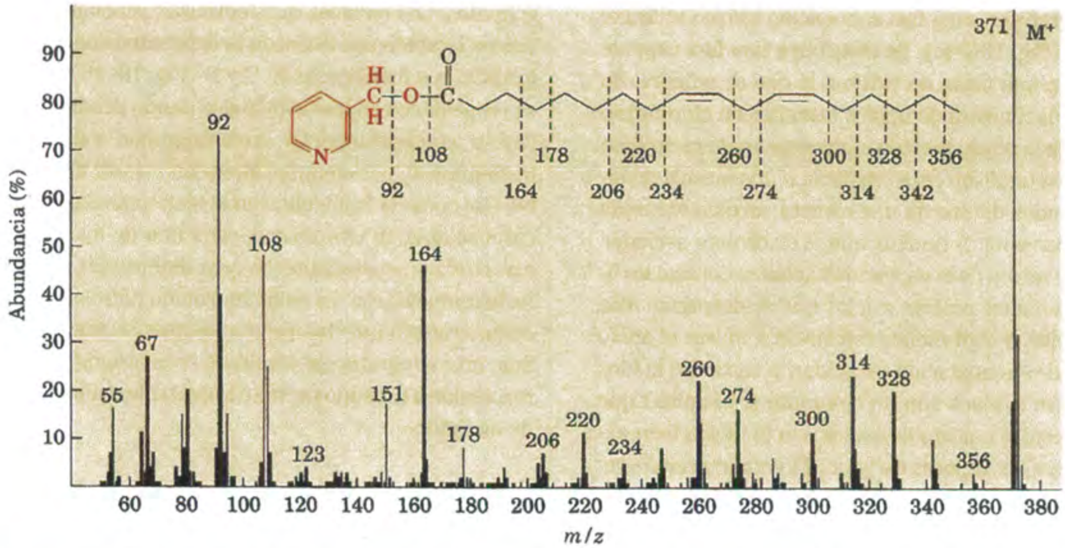


FIGURA 10–25 Determinación de la estructura de un ácido graso por espectrometría de masa. El ácido graso se convierte en primer lugar en un derivado que minimiza la migración de los dobles enlaces cuando se fragmenta la molécula mediante bombardeo por electrones. El derivado aquí mostrado es un éster picolinilo del ácido linoleico —18:2($\Delta^{9,12}$) (M_r 371)— en el que el alcohol es el picolinol (rojo). Cuando se bombardea con una corriente de electrones, esta molécula se volatiliza y se convierte en el ión inicial (M^+; M_r 371), en el que el átomo de N lleva una carga positiva, y una serie de fragmentos menores producidos por rotura de enlaces C—C en el ácido graso. El espectrómetro de masas separa estos fragmentos cargados en función de su razón masa/carga (m/z). (Para una revisión de los principios de la espectrometría de masas véase el Recuadro 3–2.)

Los iones prominentes a m/z = 92, 108, 151 y 164 contienen el anillo de piridina del picolinol y varios fragmentos del grupo carboxilo, lo que demuestra que el compuesto es, desde luego, un éster picolinilo. El ión molecular M^+ (m/z = 371) confirma la presencia de un ácido graso de C_{18} con dos dobles enlaces. La serie uniforme de iones separados por 14 unidades de masa atómica (u) representa la pérdida de sucesivos grupos metilo y metileno desde el extremo derecho de la cadena acílica (empezando en el C-18; el extremo derecho de la molécula tal como se muestra aquí), hasta que se llega al ión de m/z = 300. A éste le sigue un hueco de 26 u para los carbonos del doble enlace terminal con m/z = 274; otro hueco de 14 u para el grupo metileno C-11 a m/z = 260, etc. De esta manera se determina la estructura completa, aunque estos datos por sí solos no revelan la configuración (cis o trans) de los dobles enlaces.

tre los policétidos, que no se han descrito en este capítulo, se incluyen varios productos naturales, muchos de ellos tóxicos, con rutas biosintéticas relacionadas con las de los ácidos grasos. Las ocho categorías químicas de la Tabla 10–3 no coinciden exactamente con las divisiones según la función biológica que hemos utilizado en este capítulo. Así, los lípidos estructurales de membrana incluyen tanto glicerofosfolípidos como esfingolípidos que se consideran categorías separadas en la Tabla 10–3. Cada método de categorización tiene sus ventajas.

La aplicación de las técnicas de espectrometría de masas de alta resolución puede proporcionar catálogos cuantitativos de todos los lípidos presentes en un tipo celular específico –el **lipidoma**– en condiciones determinadas y de todas las formas en las que el lipidoma se modifica con la diferenciación, enfermedades tales como el cáncer o en el tratamiento con fármacos. Una célula animal contiene alrededor de un millar de especies lipídicas diferentes, cada una de las cuales tiene, probablemente, una función específica. Se conocen estas funciones para un número creciente de lípidos, pero el lipidoma, en gran parte sin explorar, ofrece una fuente de nuevos problemas que ha de resolver la próxima generación de bioquímicos y biólogos celulares.

RESUMEN 10.4 Trabajar con lípidos

- En la determinación de la composición lipídica, los lípidos se extraen primero de los tejidos con disolventes orgáni-

TABLA 10–3 Las ocho categorías principales de lípidos biológicos

Categoría	Código de la categoría	Ejemplos
Ácidos grasos	FA	Oleato, estearil-CoA, palmitilcarnitina
Glicerolípidos	GL	Di- y triacilgliceroles
Glicerofosfolípidos	GP	Fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina
Esfingolípidos	SP	Esfingomielina, gangliósido GM2
Lípidos esteroles	ST	Colesterol, progesterona, ácidos biliares
Lípidos prenoles	PR	Farnesol, geraniol, retinol, ubiquinona
Sacarolípidos	SL	Lipopolisacárido
Policétidos	PK	Tetraciclina, aflatoxina B_1

cos y se separan mediante cromatografía en capa fina, gas-líquido o cromatografía líquida de alta resolución.

- Se pueden utilizar fosfolipasas específicas para uno de los enlaces de un fosfolípido con el fin de generar compuestos más sencillos para su posterior análisis.
- Los lípidos individuales se identifican gracias a su comportamiento cromatográfico, su susceptibilidad a la hidrólisis por enzimas específicos o su espectrometría de masas.
- La lipidómica combina técnicas analíticas muy potentes para poder determinar la composición total de lípidos de una célula o tejido (el lipidoma) y para reunir bases de datos comentadas que permiten la comparación entre lípidos de diferentes tipos celulares y bajo condiciones diferentes.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

ácido graso 343
ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) 345
triacilgliceroles 346
lipasas 346
fosfolípidos 349
glucolípidos 349
glicerofosfolípido 350
lípido con función éter 350
plasmalógenos 350
galactolípidos 352
esfingolípidos 352
ceramida 354
esfingomielina 354
glucoesfingolípidos 354
cerebrósidos 354
globósidos 354
glucolípidos neutros 354
gangliósidos 354
esteroles 355
colesterol 356
prostaglandinas 358
tromboxanos 358
leucotrienos 359
vitamina 360
vitamina D_3 360
colecalciferol 360
vitamina A (retinol) 360
vitamina E 361
tocoferoles 361
vitamina K 361
dolicoles 362
lipidoma 366

Bibliografía

General

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Jr., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meers, G., VanNieuwenhze, M.S., White, S.H., Witztum, J.L., & Dennis, E.A. (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**, 839–862.
Nuevo sistema de nomenclatura para lípidos biológicos que los separa en ocho categorías principales. La referencia definitiva sobre la clasificación de lípidos.

Gurr, M.I., Harwood, J.L., & Frayn, K.N. (2002) *Lipid Biochemistry: An Introduction,* 5th edn, Blackwell Science Ltd., Oxford.
Buena referencia general sobre la estructura y metabolismo de los lípidos. Nivel intermedio.

Vance, D.E. & Vance, J.E. (eds). (2002) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes,* New Comprehensive Biochemistry, Vol. 36, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
Excelente colección de revisiones sobre diversos aspectos de la estructura, biosíntesis y función de los lípidos.

Los lípidos como nutrientes

Angerer, P. & von Schacky, C. (2000) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 57–63.

Covington, M.B. (2004) Omega-3 fatty acids. *Am. Fam. Physician* **70**, 133–140.
Tratamiento sucinto del descubrimiento de que los ácidos grasos omega-3 reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

de Logeril, M., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Delaye, J., & Mamelle, N. (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* **99**, 779–785.

Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, P.H., Stampfer, M.J., & Willet, W.C. (2006) Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1601–1613.
Resumen de las pruebas que demuestran que los ácidos grasos trans de la dieta predisponen para la enfermedad cardíaca coronaria.

Lípidos estructurales de las membranas

Bogdanov, M. & Dowhan, W. (1999) Lipid-assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* **274**, 36,827–36,830.
Minirrevisión sobre el papel de los lípidos de membrana en el plegamiento de las proteínas de membrana.

De Rosa, M. & Gambacorta, A. (1988) The lipids of archaebacteria. *Prog. Lipid Res.* **27**, 153–175.

Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199–232.

Gravel, R.A., Kaback, M.M., Proia, R., Sandhoff, K., Suzuki, K., & Suzuki, K. (2001) The GM2 gangliosidoses. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn (Scriver, C.R., Sly, W.S., Childs, B., Beaudet, A.L., Valle, D., Kinzler, K.W., & Vogelstein, B., eds), pp. 3827–3876, McGraw-Hill, Inc., New York.
Este artículo es uno de los muchos que se agrupan en un conjunto de cuatro volúmenes que contiene descripciones definitivas de los aspectos clínicos, bioquímicos y genéticos de cientos de enfermedades metabólicas humanas. Una fuente autorizada y una lectura fascinante.

Hoekstra, D. (ed.). (1994) *Cell Lipids,* Current Topics in Membranes, Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego.

Lípidos como señales, cofactores y pigmentos

Bell, R.M., Exton, J.H., & Prescott, S.M. (eds). (1996) *Lipid Second Messengers*, Handbook of Lipid Research, Vol. 8, Plenum Press, New York.

Binkley, N.C. & Suttie, J.W. (1995) Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J. Nutr.* **125**, 1812–1821.

Brigelius-Flohé, R. & Traber, M.G. (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* **13**, 1145–1155.

Chojnacki, T. & Dallner, G. (1988) The biological role of dolichol. *Biochem. J.* **251**, 1–9.

Clouse, S.D. (2002) Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Mol. Cell* **10**, 973–982.

Lemmon, M.A. & Ferguson, K.M. (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* **350**, 1–18.

Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., & McIntyre, T.M. (2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 419–445.

Schneiter, R. (1999) Brave little yeast, please guide us to Thebes: sphingolipid function in *S. cerevisiae. BioEssays* **21**, 1004–1010.

Suttie, J.W. (1993) Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB J.* **7**, 445–452.

Vermeer, C. (1990) γ-Carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem. J.* **266**, 625–636.

Describe las bases bioquímicas de la necesidad de vitamina K en la coagulación de la sangre y la importancia de la carboxilación en la síntesis de la proteína trombina de la coagulación de la sangre.

Viitala, J. & Järnefelt, J. (1985) The red cell surface revisited. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 392–395.

Incluye discusiones sobre los determinantes de los tipos sanguíneos A, B y O.

Weber, H. (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 217–224.

Zittermann, A. (2001) Effects of vitamin K on calcium and bone metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **4**, 483–487.

Trabajar con lípidos

Christie, W.W. (1998) Gas chromatography–mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids* **33**, 343–353.

Descripción detallada de los métodos utilizados para obtener datos tales como los que se presentan en la Figura 10–25.

Christie, W.W. (2003) *Lipid Analysis*, 3rd edn, The Oily Press, Bridgwater, England.

German, J.B., Gillies, L.A., Smilowitz, J.T., Zivkovic, A.M., & Watkins, S.M. (2007) Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 66–71.

Breve revisión sobre los objetivos y métodos de la lipidómica.

Griffiths, W., Desiderio, D.M., & Nibbering, N.M. (2007) *Lipid Mass Spectrometry in Metabolomics and Systems Biology*, Wiley InterScience, New York.

Hamilton, R.J. & Hamilton, S. (eds). (1992) *Lipid Analysis: A Practical Approach*, IRL Press, New York.

Este texto, aunque agotado se puede obtener como parte de la IRL Press *Practical Approach Series* en CD-ROM, de Oxford University Press (www.oup.usa.org/acadsci/pasbooks.html).

Matsubara, T. & Hagashi, A. (1991) FAB/mass spectrometry of lipids. *Prog. Lipid Res.* **30**, 301–322.

Un estudio avanzado sobre la identificación de lípidos mediante espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos (FAB), una poderosa técnica para la determinación de estructuras.

Watson, A.D. (2006) Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J. Lipid Res.* **47**, 2101–2111.

Revisión breve, a nivel intermedio, de las clases de lípidos, métodos para su extracción y separación y espectrometría de masas para identificar y cuantificar todos los lípidos que se encuentran en una célula, tejido u orgánulo.

Wenk, M.R. (2005) The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 594–610.

Discusión a nivel intermedio de los métodos de la lipidómica y el potencial de este enfoque en la investigación biomédica y en el desarrollo de medicamentos.

Problemas

1. Definición operacional de lípidos ¿En qué aspecto es diferente la definición de "lípido" de los tipos de definiciones utilizados con otras biomoléculas ya consideradas, tales como aminoácidos, ácidos nucleicos y proteínas?

2. Punto de fusión de los lípidos Los puntos de fusión de una serie de ácidos grasos de 18 carbonos son: ácido esteárico 69,6 °C; ácido oleico; 13,4 °C; ácido linoleico; −5 °C y ácido linolénico −11 °C.

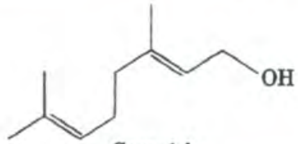
(a) ¿Qué aspecto estructural de estos ácidos grasos de 18 carbonos puede correlacionarse con el punto de fusión?

(b) Dibuje todos los triacilgliceroles posibles que se pueden construir a partir de glicerol, ácido palmítico y ácido oleico. Ordénelos según el incremento en su punto de fusión.

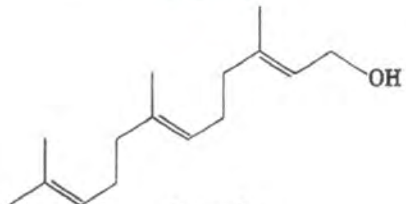
(c) Los ácidos grasos de cadena ramificada se encuentran en lípidos de membrana de algunas bacterias. ¿Su presencia aumenta o disminuye la fluidez de las membranas (es decir, tienen éstas puntos de fusión menores o mayores)? ¿Por qué?

3. Preparación de salsa bearnesa Durante la preparación de la salsa bearnesa se incorporan yemas de huevo a la mantequilla fundida para estabilizar la salsa y evitar que se corte. El agente estabilizante de la yema de huevo es la lecitina (fosfatidilcolina). Sugiera cómo funciona.

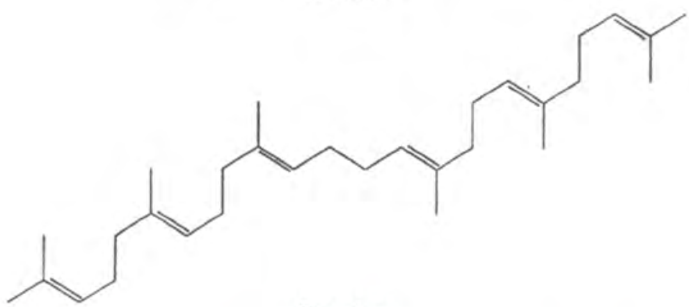
4. Unidades de isopreno en los isoprenoides Al geraniol, farnesol y escualeno se les denomina isoprenoides debido a que se sintetizan a partir de unidades isopreno de cinco carbonos. En cada compuesto rodee con un círculo las unidades de cinco carbonos que representan las unidades de isopreno (véase la Fig. 10–22).



Geraniol

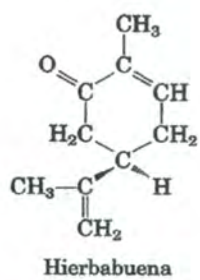


Farnesol

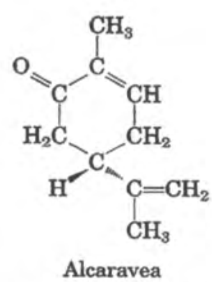


Escualeno

5. Nomenclatura de estereoisómeros lipídicos Los dos compuestos representados a continuación son estereoisómeros de la carvona con propiedades muy diferentes; el de la izquierda huele a hierbabuena mientras que el de la derecha huele como la alcaravea. Nombre los compuestos utilizando el sistema RS.

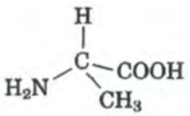


Hierbabuena

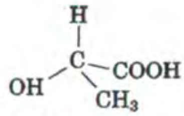


Alcaravea

6. Designaciones RS de la alanina y el lactato Dibuje (utilizando la notación de cuñas para los enlaces) y marque los isómeros (*R*) y (*S*) del ácido 2-aminopropanoico (alanina) y del ácido 2-hidroxipropanoico (ácido láctico).



Ácido 2-aminopropanoico
(alanina)



Ácido 2-hidroxipropanoico
(ácido láctico)

7. Componentes hidrofóbicos e hidrofílicos de los lípidos de membrana Un rasgo estructural común de los lípidos de membrana es su naturaleza anfipática. Por ejemplo, en la fosfatidilcolina, las dos cadenas de ácido graso son hidrofóbicas y el grupo de cabeza fosfocolina es hidrofílico. De cada uno de los siguientes lípidos de membrana indique los componentes que constituyen las unidades hidrofóbicas y las hidrofílicas: (a) fosfatidiletanolamina; (b) esfingomielina; (c) galactosilcerebrósido; (d) gangliósido; (e) colesterol.

8. Estructura de un ácido graso omega-6 Dibuje la estructura del ácido graso omega-6, 16:1.

9. Hidrogenación catalítica de aceites vegetales La hidrogenación catalítica, utilizada en la industria alimentaria, convierte los dobles enlaces de los ácidos grasos de los triacilgliceroles en $—CH_2—CH_2—$. ¿De qué modo afecta este proceso a las propiedades físicas de los aceites?

10. Labilidad a los álcalis de los triacilgliceroles Un procedimiento corriente para limpiar de grasa el sifón de un fregadero es añadir un producto que contiene hidróxido sódico. Explique por qué funciona.

11. Deducción de la estructura lipídica a partir de la composición El análisis de la composición de cierto lípido muestra que tiene exactamente un mol de ácido graso por molécula de fosfato inorgánico. ¿Podría tratarse de un glicerofosfolípido? ¿De un gangliósido? ¿De una esfingomielina?

12. Deducción de la estructura lipídica a partir de la razón molar de los componentes La hidrólisis completa de un glicerofosfolípido da glicerol, dos ácidos grasos ($16{:}1(\Delta^9)$ y 16:0), ácido fosfórico y serina en proporción molar 1:1:1:1. Nombre este lípido y dibuje su estructura.

13. Impermeabilidad de las ceras ¿Qué propiedad de las cutículas céreas que cubren las hojas de las plantas hace que dichas cutículas sean impermeables al agua?

14. Acción de las fosfolipasas Los venenos de la serpiente de cascabel del este de Estados Unidos y de la cobra de la India contienen fosfolipasa A_2 que cataliza la hidrólisis de ácidos grasos en la posición C-2 de glicerofosfolípidos. El producto de esta reacción de rotura del fosfolípido es la lisolecitina (la lecitina es una fosfatidilcolina). A elevadas concentraciones, éste y otros lisofosfolípidos actúan como detergentes, disolviendo la membrana de los eritrocitos y lisando las células. La hemólisis generalizada puede ser amenazadora para la vida.

(a) Todos los detergentes son anfipáticos. ¿Cuáles son las partes hidrofílicas e hidrofóbicas de la lisolecitina?

(b) El dolor y la inflamación causados por la mordedura de serpiente pueden tratarse con ciertos esteroides. ¿Cuál es la base de este tratamiento?

(c) Si bien niveles elevados de fosfolipasa A_2 pueden ser mortales, este enzima es necesario para varios procesos metabólicos habituales. ¿Cuáles son estos procesos?

15. Lípidos en la determinación del grupo sanguíneo Hemos puesto de manifiesto en la Figura 10–15 que la estructura de los glucoesfingolípidos determina los grupos sanguíneos A, B y O en la especie humana. También es cierto que las glucoproteínas determinan los grupos sanguíneos. ¿Cómo pueden ser ciertas ambas afirmaciones?

16. Mensajeros intracelulares a partir de fosfatidilinositoles Cuando la hormona vasopresina estimula la rotura del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato por la fosfolipasa C dependiente de hormona, se forman dos productos. ¿Cuáles son? Compare sus propiedades y solubilidades en agua y prediga si es esperable que alguno de ellos difunda rápidamente en el citosol.

17. Almacenamiento de vitaminas liposolubles A diferencia de las vitaminas hidrosolubles, que deben ser parte de nuestra dieta diaria, las vitaminas liposolubles se pueden almacenar en el cuerpo en cantidades suficientes para varios meses. Sugiera una explicación para esta diferencia de comportamiento.

18. Hidrólisis de lípidos Nombre los productos obtenidos en la hidrólisis suave con NaOH diluido de: (a) 1-estearil-2,3-dipalmitilglicerol; (b) 1-palmitil-2-oleilfosfatidilcolina.

19. Efecto de la polaridad sobre la solubilidad Clasifique en orden de solubilidad creciente en agua: un triacilglicerol, un diacilglicerol y un monoacilglicerol que contengan solamente ácido palmítico.

20. Separación cromatográfica de lípidos Se aplica una mezcla de lípidos a una columna de gel de sílice y, a continuación, la columna se lava con disolventes cada vez más polares. La mezcla consiste en: fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, colesteril palmitato (un éster de esterol), esfingomielina, palmitato, *n*-tetradecanol, triacilglicerol y colesterol. ¿En qué orden espera que eluyan los lípidos de la columna? Explique su razonamiento.

21. Identificación de lípidos desconocidos Johann Thudichum, que practicó la medicina en Londres hace unos 100 años, también se interesó por la química de los lípidos en su tiempo libre. Aisló diversos lípidos del tejido nervioso caracterizando y poniendo nombre a muchos de ellos. Sus viales de lípidos aislados, cuidadosamente sellados y marcados, fueron redescubiertos muchos años después.

(a) ¿Cómo podría confirmar, utilizando técnicas que no estaban disponibles en época de Thudichum, que los viales marcados "esfingomielina" y "cerebrósido" contienen realmente estos compuestos?

(b) ¿Cómo podría distinguir la esfingomielina de la fosfatidilcolina mediante ensayos químicos, físicos o enzimáticos?

22. La ninhidrina para detectar lípidos en placas de cromatografía en capa fina La ninhidrina reacciona específicamente con las aminas primarias formando un producto azul purpúreo. Una cromatografía en capa fina que contiene fosfolípidos de hígado de rata se pulveriza con ninhidrina y se deja que se forme el color. ¿Qué fosfolípidos se pueden detectar así?

Problema de análisis de datos

23. Determinación de la estructura del lípido anormal en la enfermedad de Tay-Sachs La Figura 1 del Recuadro 10–2 muestra la ruta de degradación de gangliósidos en individuos sanos (normales) y en individuos con ciertas enfermedades genéticas. Algunos de los datos en que se basa la figura fueron presentados por Lars Svennerholm (1962). Observe que el azúcar Neu5Ac, ácido *N*-acetilneuramínico, representado en la figura del Recuadro 10-2 mediante ◆, es un ácido siálico.

Svennerholm indicó que "alrededor del 90% de los monosialogangliósidos aislados de cerebro humano normal" consistía en un compuesto que contenía ceramida, hexosa, *N*-acetilgalactosamina y ácido *N*-acetilneuramínico en proporción molar 1:3:1.1.

(a) ¿Cuál de los gangliósidos (de GM1 a GM3 y globósido) de la Figura 1 del Recuadro10–2 concuerda con esta descripción? Explique su razonamiento.

(b) Svennerholm indicó que el 90% de los gangliósidos de un paciente con la enfermedad de Tay-Sachs tenía una proporción molar (de los mismos cuatro componentes indicados previamente) de 1:2:1:1. ¿Está ello de acuerdo con la figura del Recuadro 10–2? Explique por qué.

Para determinar la estructura con mayor detalle, Svennerholm trató los gangliósidos con neuraminidasa para eliminar el ácido *N*-acetilneuramínico. Esto condujo a un asialogangliósido mucho más fácil de analizar. Lo hidrolizó con ácido, recogió los productos que contenían ceramida y determinó la proporción molar de los azúcares de cada producto. Lo hizo tanto con el gangliósido normal como con el de Tay-Sachs. Los resultados se muestran en la tabla de la segunda columna.

(c) Basándose en estos datos, ¿qué puede concluir acerca de la estructura del gangliósido normal? ¿Está de acuerdo con la estructura del Recuadro 10–2? Explique por qué.

(d) ¿Qué puede concluir acerca de la estructura del gangliósido de Tay-Sachs? ¿Está de acuerdo con la estructura del Recuadro 10–2? Explique por qué.

Svennerholm también describió el trabajo de otros investigadores que "permetilaron" el asialogangliósido normal. Permetilación es lo mismo que metilación exhaustiva: se adiciona un grupo metilo a cada hidroxilo libre de un azúcar. Encontraron los siguientes azúcares permetilados: 2,3,6-trimetilglucopiranosa; 2,3,4,6-tetrametilgalactopiranosa; 2,4,6-trimetilgalactopiranosa y 4,6-dimetil-2-desoxi-2-aminogalactopiranosa.

Gangliósido	Ceramida	Glucosa	Galactosa	Galactosamina
Normal				
Fragmento 1	1	1	0	0
Fragmento 2	1	1	1	0
Fragmento 3	1	1	1	1
Fragmento 4	1	1	2	1
Tay-Sachs				
Fragmento 1	1	1	0	0
Fragmento 2	1	1	1	0
Fragmento 3	1	1	1	1

(e) ¿A qué azúcar del GM1 corresponde cada uno de los azúcares permetilados?

(f) Basándose en todos los datos hasta aquí presentados, ¿qué información falta acerca de la estructura del gangliósido normal?

Referencia

Svennerholm, L. (1962) The chemical structure of normal human brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 436–441.

Buenas vallas hacen buenos vecinos.

—*Robert Frost, "Mending Wall," en* North of Boston, *1914*

11

Membranas biológicas y transporte

Probablemente la primera célula apareció cuando se formó una membrana que encerraba un pequeño volumen de solución acuosa y lo separaba del resto del universo. Las membranas definen los límites externos de las células y regulan el tráfico molecular a través de estos límites **(Fig. 11–1)**; en células eucarióticas dividen el espacio interno en compartimientos discretos para segregar procesos y componentes. Organizan secuencias complejas de reacciones y son de importancia principal tanto para la conservación de la energía biológica como para la comunicación intercelular. Las actividades biológicas de las membranas son consecuencia de sus notables propiedades físicas. Las membranas son flexibles, autosellantes y selectivamente permeables a los solutos polares. Su flexibilidad les permite los cambios de forma

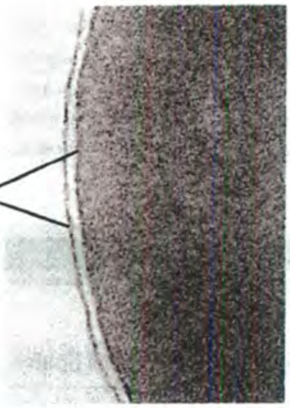


FIGURA 11–1 Membranas biológicas. Vistas en sección transversal, todas las membranas celulares comparten una apariencia trilaminar característica. Cuando se tiñe un eritrocito con tetróxido de osmio y se observa al microscopio electrónico, la membrana plasmática aparece como una estructura de tres capas, de 5 a 8 nm (50 a 80 Å) de grosor. Las imágenes trilaminares consisten en dos capas densas en electrones (el osmio unido a las superficies externa e interna de la membrana) separadas por una región central menos densa.

que acompañan el crecimiento celular y el movimiento (tal como el movimiento ameboide). Su capacidad para romperse y volverse a sellar permite que se fusionen dos membranas, como sucede en la exocitosis, o que un compartimiento sencillo dentro de una membrana pueda experimentar una fisión dando lugar a la formación de dos compartimientos sellados tal como ocurre en la endocitosis o en la división celular sin que se produzcan grandes pérdidas a través de la superficie celular. Dado que las membranas son selectivamente permeables retienen ciertos compuestos e iones dentro de las células y de los compartimientos celulares específicos al tiempo que excluyen a otros.

Las membranas no son meras barreras pasivas. Incluyen en su composición un conjunto de proteínas especializadas en promover o catalizar procesos celulares. En la superficie celular los transportadores mueven solutos orgánicos así como iones inorgánicos a través de la membrana; los receptores captan señales externas y provocan cambios moleculares en la célula y las moléculas de adhesión mantienen células vecinas unidas. Dentro de la célula existen membranas que organizan procesos celulares tales como la síntesis de lípidos y de ciertas proteínas, y la transducción de energía en mitocondrias y cloroplastos. Las membranas están compuestas sólo por dos capas de moléculas por lo que son muy delgadas; se las puede considerar como bidimensionales. Debido a que las colisiones intermoleculares son mucho más probables en este espacio bidimensional que en el espacio tridimensional la eficiencia de ciertas rutas catalizadas enzimáticamente es mucho mayor en una membrana bidimensional.

En este capítulo describimos en primer lugar la composición de las membranas celulares y su arquitectura química, la estructura molecular sobre la que se asientan sus funciones biológicas. A continuación describiremos las extraordinarias características dinámicas de las membranas en las que lípidos y proteínas se desplazan unos con respecto a las otras. La adhesión celular, la endocitosis y las fusiones de membrana que tienen lugar tras la secreción de un neurotransmisor ilustrarán el papel dinámico de las proteínas de membrana. Pasaremos luego al transporte de solutos a través de las membranas con intervención de proteínas, mediante transportadores y canales iónicos. En capítulos posteriores describiremos el papel de las membranas en la transducción de señales (Capítulos 12 y 23), transducción de energía (Capítulo 19), síntesis de lípidos (Capítulo 21) y síntesis de proteínas (Capítulo 27).

11.1 Composición y arquitectura de las membranas

Una manera de entender la función de las membranas es estudiar su composición para determinar, por ejemplo, qué componentes están normalmente presentes en todas las membranas y cuáles se encuentran únicamente en membranas con funciones específicas. Antes de describir la estructura y función de la membrana consideraremos los componentes moleculares de las mismas: las proteínas y los lípidos polares que constituyen casi la totalidad de la masa de las membranas biológicas, y los glúcidos presentes formando parte de glucoproteínas y glucolípidos.

Cada tipo de membrana presenta una composición de proteínas y lípidos característica

Las proporciones relativas de proteína y lípido varían con cada tipo de membrana (Tabla 11–1), lo que refleja la diversidad de papeles biológicos. Por ejemplo, ciertas neuronas tienen una vaina de mielina, una membrana plasmática extensa que se enrolla alrededor de la célula muchas veces y que actúa como aislante eléctrico pasivo. La vaina de mielina consiste principalmente en lípidos, mientras que las membranas plasmáticas de bacterias y las membranas de mitocondrias y cloroplastos en las que tienen lugar muchos procesos metabólicos catalizados enzimáticamente contienen más proteína que lípido (en masa sobre masa total).

Para los estudios de la composición de membranas es esencial en primer lugar aislar la membrana de interés. Cuando se someten las células eucarióticas a fuerzas mecánicas de cizalla sus membranas plasmáticas se desgarran y fragmentan liberando componentes citoplasmáticos y orgánulos unidos a membranas tales como mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y núcleos. Los fragmentos de la membrana plasmática y los orgánulos intactos pueden aislarse mediante las técnicas descritas en el Capítulo 1 (véase la Fig. 1–8) y en el Ejemplo Práctico 2-1, p. 53.

Está claro que las células poseen mecanismos para controlar las clases y cantidades de lípidos de membrana que sintetizan y dirigir, además, determinados lípidos a orgánulos concretos. Cada reino, cada especie, cada tejido o cada tipo celular, así como los orgánulos dentro de un tipo determinado de célula, tienen un conjunto característico de lípidos de membrana. La membrana plasmática, por ejemplo, está enriquecida en colesterol y no contiene cardiolipina en cantidades detectables **(Fig. 11–2)**; en la membrana mitocondrial interna la distribución es inversa con muy poco colesterol y mucha cardiolipina. Excepto en unos pocos casos se desconoce el significado funcional de estas combinaciones.

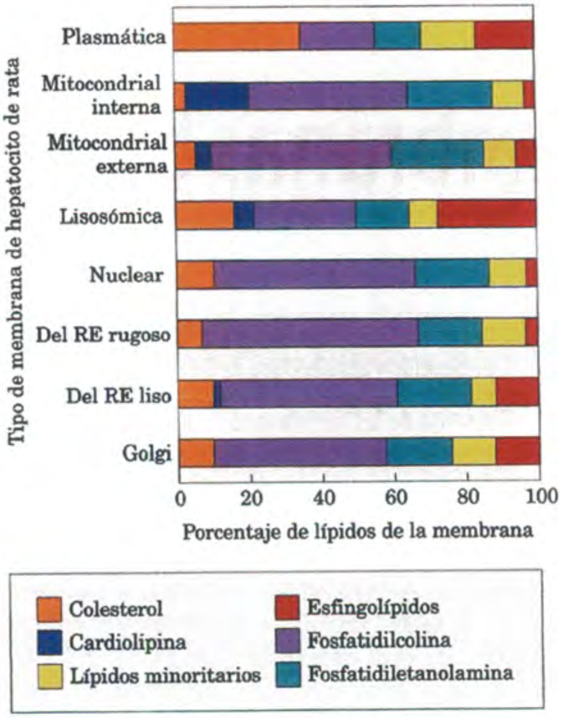


FIGURA 11–2 Composición lipídica de la membrana plasmática y de las membranas de los orgánulos de un hepatocito de rata. La especialización funcional de cada tipo de membrana se refleja en su composición lipídica característica. El colesterol es prominente en membranas plasmáticas pero es apenas detectable en membranas mitocondriales. La cardiolipina es un componente mayoritario de la membrana mitocondrial interna pero no de la membrana plasmática. La fosfatidilserina, el fosfatidilinositol y el fosfatidilglicerol son componentes relativamente minoritarios (amarillo) de la mayoría de membranas pero desempeñan funciones críticas; el fosfatidilinositol y sus derivados, por ejemplo, son importantes en la transducción de señales desencadenadas por hormonas. Los esfingolípidos, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina están presentes en la mayoría de membranas, pero en proporciones variables. Los glucolípidos, que son los componentes mayoritarios de las membranas de los cloroplastos de plantas, están prácticamente ausentes de las células animales.

TABLA 11–1 Componentes mayoritarios de las membranas plasmáticas en varios organismos

	Componentes (% en peso)				
	Proteína	Fosfolípido	Esterol	Tipo de esterol	Otros lípidos
Vaina de mielina humana	30	30	19	Colesterol	Galactolípidos, plasmalógenos
Hígado de ratón	45	27	25	Colesterol	—
Hoja de maíz	47	26	7	Sitosterol	Galactolípidos
Levadura	52	7	4	Ergosterol	Triacilgliceroles, ésteres esterólicos
Paramecio (protista ciliado)	56	40	4	Estigmasterol	—
E. coli	75	25	0	—	—

Nota: Los valores no suman 100% en todos los casos, porque hay otros componentes además de proteína, fosfolípidos y esteroles; las plantas, por ejemplo, tienen concentraciones elevadas de glucolípidos.

La composición proteica de membranas de orígenes diferentes varía aún más ampliamente que su composición lipídica, lo que refleja su especialización funcional. Por ejemplo, en la glucoforina, una glucoproteína de la membrana plasmática de eritrocito, el 60% de la masa consiste en oligosacáridos complejos unidos covalentemente a residuos aminoácidos específicos. Los residuos de Ser, Thr y Asn son los puntos más comunes de unión (véase la Fig. 7–29). Las porciones glucídicas de las glucoproteínas de la superficie influyen en el plegamiento de las proteínas, en su estabilidad y en el destino intracelular, y juegan un papel importante en la unión específica de ligandos a los receptores glucoproteicos de la superficie (véase la Fig. 7–35).

Algunas proteínas de membrana están unidas de forma covalente a uno o más lípidos, que actúan como anclas hidrofóbicas, manteniendo las proteínas unidas a la membrana, tal como veremos.

Todas las membranas biológicas comparten ciertas propiedades fundamentales

Las membranas son impermeables a la mayoría de solutos polares o cargados, pero son permeables a los compuestos apolares; tienen de 5 a 8 nm de grosor (50 a 80 Å) y tienen aspecto trilaminar cuando se observan en sección transversal con el microscopio electrónico (Fig. 11–1). Las pruebas combinadas de microscopia electrónica y estudios de composición química, así como estudios físicos de permeabilidad y del movimiento de moléculas individuales de proteínas y lípidos dentro de las membranas, condujeron al **modelo de mosaico fluido** para la estructura de las membranas biológicas **(Fig. 11–3)**. Los fosfolípidos forman una bicapa, en la que las regiones apolares de las moléculas lipídicas de cada capa están encaradas hacia el centro de la bicapa y sus grupos de cabeza polares están encarados hacia el exterior interaccionando con la fase acuosa a cada lado. Las proteínas están incrustadas en esta bicapa lipídica y se mantienen mediante interacciones hidrofóbicas entre los lípidos de la membrana y los dominios hidrofóbicos de las proteínas. Algunas proteínas sobresalen a un solo lado de la membrana; otras tienen dominios expuestos a ambos lados. La orientación de las proteínas en la bicapa es asimétrica, lo que confiere "lateralidad" a la membrana; los dominios proteicos expuestos a un lado de la bicapa son diferentes de los expuestos al otro lado, reflejando una asimetría funcional. Los lípidos individuales y las unidades proteicas de una membrana forman un mosaico fluido con un patrón que, a diferencia de un mosaico de cerámica y mortero, puede cambiar constantemente. El mosaico de la membrana es fluido porque la mayoría de interacciones entre sus componentes son no covalentes, dejando libertad a las moléculas de lípidos y de proteínas para trasladarse lateralmente en el plano de la membrana.

Repasaremos ahora con más detalle algunas de estas características del modelo de mosaico fluido y consideraremos las pruebas experimentales que apoyan el modelo básico pero que ha necesitado ser refinado en diversos aspectos.

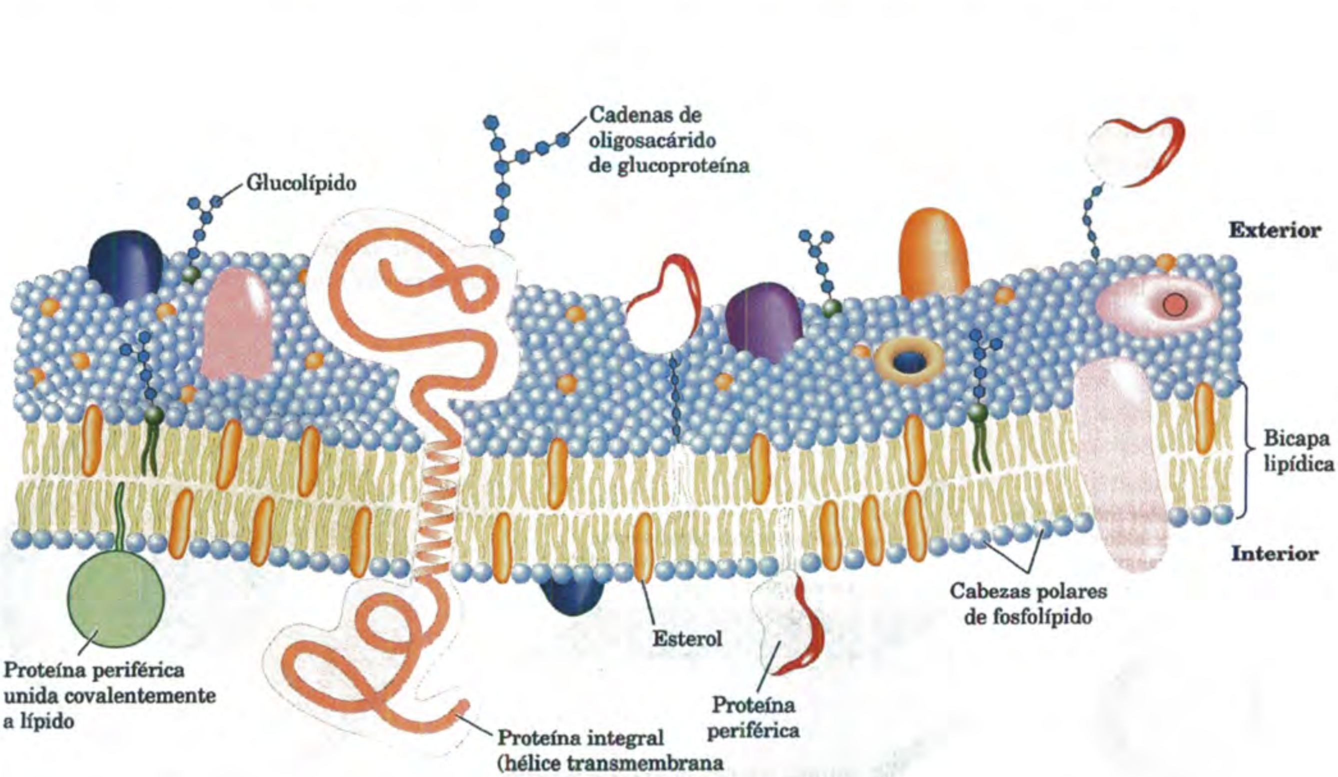


FIGURA 11–3 Modelo del mosaico fluido para la estructura de la membrana. Las cadenas de acilo graso en el interior de la membrana forman una región hidrofóbica fluida. Las proteínas integrales flotan en este mar de lípidos, sostenidas por interacciones hidrofóbicas con sus cadenas laterales de aminoácidos apolares. Tanto las proteínas como los lípidos se pueden desplazar libremente en el plano de la bicapa, pero el movimiento de una cara de la bicapa a la otra está restringido. Las porciones de glúcido unidas a algunas proteínas y lípidos de la membrana plasmática están expuestas en la cara extracelular de la superficie de la membrana.

El elemento básico estructural de las membranas es una bicapa lipídica

Los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroles son prácticamente insolubles en agua. Cuando se mezclan con agua, forman espontáneamente agregados lipídicos microscópicos agrupándose con sus partes hidrofóbicas en contacto mientras que sus grupos hidrofílicos interactúan con el agua que los envuelve. Los agregados lipídicos disminuyen la superficie hidrofóbica expuesta al agua y así minimizan el número de moléculas en la capa de agua ordenada en la interfase lípido-agua (véase la Fig. 2–7), dando lugar así a un incremento de entropía. Las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de lípido proporcionan la fuerza termodinámica que impulsa la formación y el mantenimiento de estos agregados.

En función de las condiciones precisas y de la naturaleza de los lípidos, se forman tres tipos de agregados lipídicos cuando los lípidos anfipáticos se mezclan con agua **(Fig. 11–4)**. Las **micelas** son estructuras esféricas que contienen entre unas pocas docenas y algunos miles de moléculas anfipáticas ordenadas con sus regiones hidrofóbicas hacia el interior, de donde queda excluida el agua, y sus grupos de cabeza hidrofílicos en la superficie, en contacto con el agua. La formación de las micelas está favorecida cuando el área de la sección transversal del grupo de cabeza es mayor que la de las cadenas laterales acílicas, tales como las de los ácidos grasos libres, lisofosfolípidos (fosfolípidos a los que les falta un ácido graso) y detergentes como el dodecilsulfato de sodio (SDS; p. 89).

Un segundo tipo de agregado lipídico en agua es la **bicapa,** en la cual dos monocapas de lípidos forman una hoja bidimensional. La formación de la bicapa tiene lugar fácilmente cuando la sección transversal del grupo de cabeza y las cadenas laterales acílicas son similares, como en el caso de glicerofosfolípidos y esfingolípidos. Las porciones hidrofóbicas en cada monocapa, excluidas del agua, interaccionan entre sí. Los grupos de cabeza hidrofílicos interaccionan con el agua en cada superficie de la bicapa. Dado que las regiones hidrofóbicas en sus extremos (Fig. 11–4b) están en contacto con el agua, la hoja en bicapa es relativamente inestable y espontáneamente se repliega sobre sí misma formando una esfera hueca llamada **vesícula** (Fig. 11–4c). La superficie continua de las vesículas elimina las regiones hidrofóbicas expuestas permitiendo que las bicapas alcancen máxima estabilidad dentro del entorno acuoso. La formación de vesículas también crea un compartimiento acuoso separado. Es probable que los precursores de las primeras células vivas se asemejaran a vesículas lipídicas, en las que su contenido acuoso se mantendría separado del exterior gracias a una capa hidrofóbica.

La bicapa lipídica tiene unos 3 nm (30 Å) de grosor. El núcleo hidrocarbonado formado por los grupos $—CH_2—$ y $—CH_3$ de los acilos grasos es tan apolar como el decano y las vesículas formadas en el laboratorio a partir de lípidos puros (liposomas) son prácticamente impermeables a los solutos polares al igual que la bicapa lipídica de las membranas biológicas (aunque estas últimas, tal como veremos, son permeables a los solutos para los que disponen de transportadores específicos).

Los lípidos de la membrana plasmática son asimétricos en su distribución entre las dos monocapas de la bicapa, aunque la asimetría, a diferencia de la de las proteínas de membrana, no es absoluta. En la membrana plasmática de los eritrocitos, por ejemplo, los lípidos que contienen colina (fosfatidilcolina y esfingomielina) se encuentra principalmente en la cara externa de la bicapa (extracelular o exoplasmática) **(Fig. 11–5)**, mientras que fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y los fosfatidilinositoles son mucho más frecuentes en la cara interna (citoplasmática). Los cambios en la distribución de lípidos entre las hojas de la membrana plasmática tienen consecuencias biológicas. Por ejemplo, sólo cuando la fosfatidilserina de la membrana plasmática pasa a la cara externa una plaqueta puede realizar su papel en la formación de un coágulo sanguíneo. Para muchos otros tipos de células, la exposición de la fosfatidilserina en la superficie externa marca una célula para su destrucción por muerte celular programada.

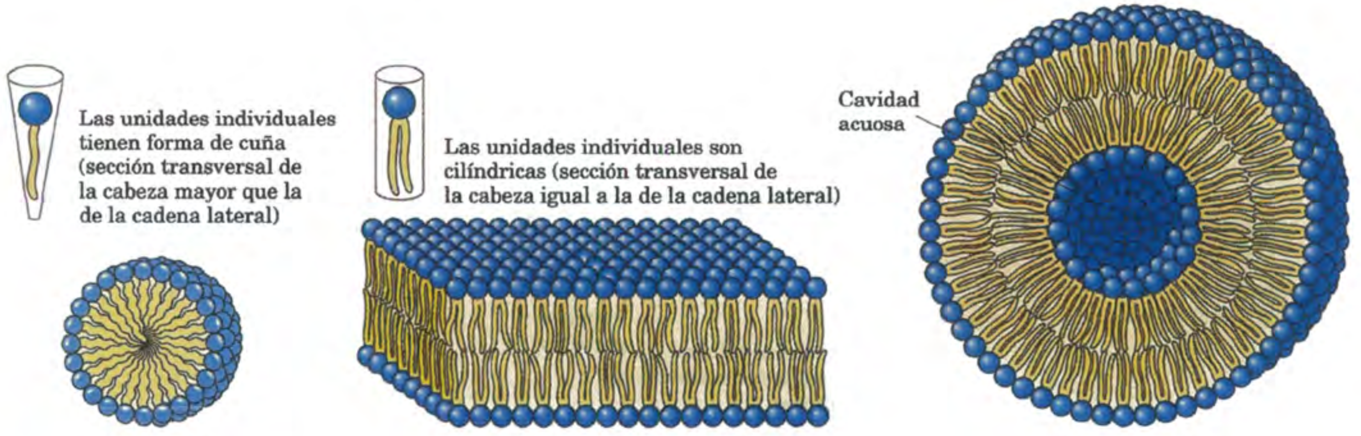


FIGURA 11–4 Agregados de lípidos anfipáticos que se forman en el agua. **(a)** En las micelas, las cadenas hidrofóbicas de los ácidos grasos se hallan secuestradas en el núcleo de la esfera. No hay prácticamente agua en el interior hidrofóbico. **(b)** En una bicapa abierta, todas las cadenas laterales acilo excepto las que están en los bordes de la lámina están protegidas de la interacción con el agua. **(c)** Cuando una bicapa bidimensional se pliega sobre sí misma, forma una bicapa cerrada, una vesícula hueca tridimensional (liposoma) que encierra una cavidad acuosa.

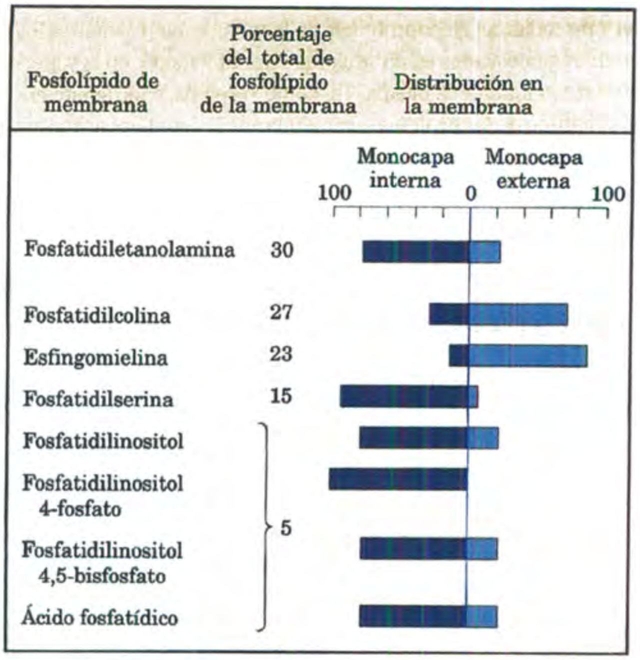


FIGURA 11–5 Distribución asimétrica de fosfolípidos entre las monocapas interna y externa de la membrana plasmática del eritrocito. La distribución de un fosfolípido específico se determina al tratar la célula intacta con fosfolipasa C, la cual no puede alcanzar lípidos de la monocapa (hoja) interna pero elimina los grupos de cabeza de lípidos en la monocapa externa. La proporción de cada grupo de cabeza eliminado proporciona una estimación de la fracción de cada lípido en la monocapa externa.

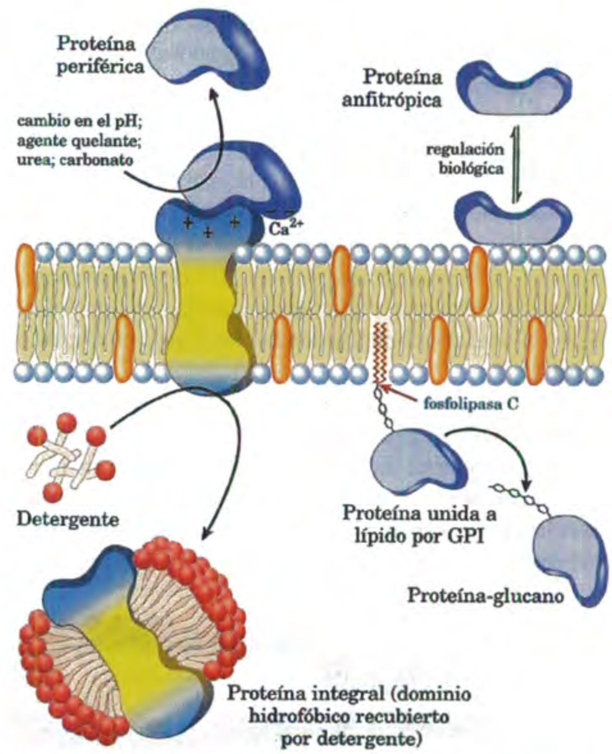


FIGURA 11–6 Proteínas periféricas, integrales y anfitrópicas. Las proteínas de membrana se pueden distinguir operacionalmente por las condiciones requeridas para liberarlas de la membrana. La mayoría de las proteínas periféricas se pueden liberar por cambios en el pH o en la fuerza iónica, eliminación de Ca^{2+} por un agente quelante, o la adición de urea o carbonato. Las proteínas integrales pueden ser extraídas con detergentes, que destruyen las interacciones hidrofóbicas dentro de la bicapa lipídica y forman agrupaciones parecidas a micelas alrededor de moléculas proteicas individuales. Las proteínas integrales unidas covalentemente a un lípido de membrana, tal como el glucosil fosfatidilinositol (GPI; véase la Fig. 11–14), pueden ser liberadas mediante el tratamiento con fosfolipasa C. Las proteínas anfitrópicas están unas veces asociadas con membranas y otras no, según algún tipo de proceso regulador tal como la palmitilación reversible.

Tres tipos de proteínas de membrana difieren en su asociación con la misma

Las **proteínas integrales de membrana** están firmemente unidas a la bicapa lipídica y sólo se pueden liberar por la acción de agentes que interfieren con las interacciones hidrofóbicas tales como detergentes, disolventes orgánicos o desnaturalizantes **(Fig. 11–6)**.

Las **proteínas periféricas de membrana** se asocian con la membrana a través de interacciones electroestáticas y enlaces de hidrógeno con los dominios hidrofílicos de las proteínas integrales y con los grupos de las cabezas polares de los lípidos de membrana. Estas proteínas pueden liberarse mediante tratamientos relativamente suaves que interfieren con las interacciones electroestáticas o rompen los puentes de hidrógeno; un agente utilizado habitualmente es el carbonato a pH elevado.

Las **proteínas anfitrópicas** se encuentran tanto en el citosol como asociadas a membranas. Su afinidad por las membranas proviene, en algunos casos, de las interacciones no covalentes de la proteína con una proteína o lípido de membrana, y en otros casos de la presencia de uno o más lípidos unidos covalentemente a la proteína anfitrópica (véase la Fig. 11–14). Generalmente, la asociación reversible de proteínas anfitrópicas con la membrana está regulada; por ejemplo, la fosforilación o la unión de un ligando puede producir un cambio conformacional en la proteína que da lugar a la exposición de un sitio de unión a membrana que, previamente, era inaccesible.

Muchas proteínas de membrana abarcan la bicapa lipídica

La topología de las proteínas de membrana (localización de los dominios proteicos relativa a la bicapa lipídica) puede ser investigada con reactivos que reaccionan con las cadenas laterales de la proteína pero que no pueden cruzar la membrana (reactivos químicos polares que reaccionan con aminas primarias de residuos Lys, por ejemplo, o enzimas como la tripsina que corta proteínas pero que no puede cruzar la membrana). Para estos estudios es muy útil el eritrocito humano debido a que no tiene orgánulos unidos a membrana y a que la membrana plasmática es la única membrana presente. Si una proteína de membrana de un eritrocito intacto reacciona con un agente impermeable a la membrana, una parte de esta proteína debe estar expuesta hacia la cara exterior (extracelular) de la membrana. La tripsina corta los dominios extracelulares pero no afecta a los dominios que permanecen sepultados dentro de la bicapa o expuestos solamente en la superficie interior a menos que se rompa la membrana plasmática y estos dominios sean accesibles al enzima.

Experimentos con tales reactivos con especificidad topológica muestran que la glucoproteína del eritrocito **glucoforina**

abarca la totalidad de la membrana plasmática. Su dominio amino-terminal (portador de las cadenas de glúcidos) se halla en la superficie externa y puede cortarse con tripsina. El extremo carboxi-terminal sobresale hacia el interior de la célula donde no puede reaccionar con reactivos impermeables. Tanto el dominio amino-terminal como el carboxi-terminal contienen muchos residuos aminoácidos polares o cargados y son, por tanto, hidrofílicos. Pero, hay un segmento en el centro de la proteína (residuos 75 a 93) que contiene mayoritariamente residuos aminoácidos hidrofóbicos lo que sugiere que la glucoforina tiene un segmento transmembrana ordenado tal como se muestra en la **Figura 11–7**.

Estos experimentos no cristalográficos también revelaron que la orientación de la glucoforina en la membrana es asimétrica: su segmento amino-terminal se encuentra siempre en el exterior. Estudios similares con otras proteínas de membrana muestran que cada una tiene una orientación específica en la bicapa lo que le comunica una lateralidad determinada. En el caso de la glucoforina y de todas las glucoproteínas de la membrana plasmática los dominios glucosilados están situados invariablemente en la superficie extracelular de la bicapa. Tal como veremos, el ordenamiento asimétrico de las proteínas de membrana les confiere asimetría funcional. Todas las moléculas de una bomba iónica determinada, por ejemplo, tienen la misma orientación en la membrana, por lo que todas ellas bombean en la misma dirección.

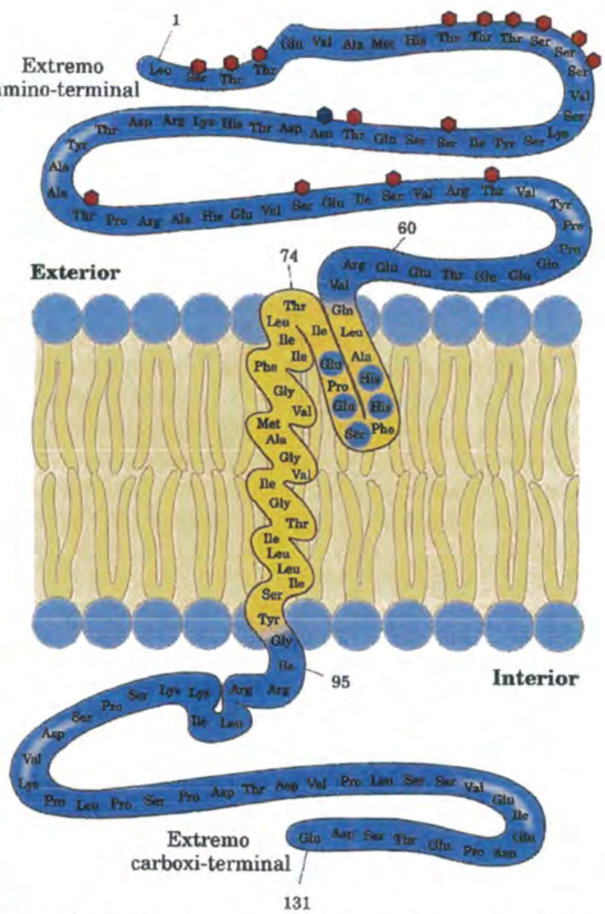


FIGURA 11–7 Disposición transbicapa de la glucoforina en el eritrocito. Un dominio hidrofílico, que contiene todos los residuos de azúcar, se encuentra en la superficie externa y otro dominio hidrofílico sobresale desde la cara interna de la membrana. Cada hexágono rojo representa un tetrasacárido (que contiene dos Neu5Ac (ácido siálico), Gal y GalNAc) unido por *O* a una Ser o una Thr; el hexágono azul representa una cadena de oligosacárido unida por *N* a un residuo de Asn. El tamaño relativo de las unidades de oligosacárido es mayor que el que aquí se muestra. Un segmento de 19 residuos hidrofóbicos (residuos del 75 al 93) forman una hélice α que atraviesa la bicapa de la membrana (véase la Fig. 11–11a). El segmento desde el residuo 64 al 74 tiene algunos residuos hidrofóbicos y probablemente, tal como se muestra, penetra en la cara externa de la bicapa lipídica.

Las proteínas integrales son sostenidas en la membrana por interacciones hidrofóbicas con lípidos

La unión firme de las proteínas integrales a las membranas es el resultado de interacciones hidrofóbicas entre los lípidos de membrana y los dominios hidrofóbicos de la proteína. En algunas proteínas existe una sola secuencia hidrofóbica en el centro de la proteína (tal como sucede en la glucoforina) o en el extremo amino o carboxilo. Otras tienen múltiples secuencias hidrofóbicas, y cada una de ellas, cuando adoptan conformación de hélice α, tiene una longitud suficiente para abarcar la bicapa lipídica **(Fig. 11–8)**.

Una de las proteínas que abarcan la membrana y que está mejor estudiada es la bacteriorrodopsina que contiene siete secuencias internas muy hidrofóbicas y que cruza siete veces la bicapa lipídica. La bacteriorrodopsina es una bomba de protones accionada por la luz que está densamente empaquetada en formaciones regulares en la membrana púrpura de la bacteria *Halobacterium salinarum*. La cristalografía de rayos X revela una estructura con siete segmentos α-helicoidales, cada uno de los cuales atraviesa la bicapa lipídica y que están conectados por bucles no helicoidales en las caras externa e interna de la membrana **(Fig. 11–9)**. En la secuencia de aminoácidos de la bacteriorrodopsina pueden identificarse siete segmentos de unos 20 residuos hidrofóbicos, cada uno con longitud suficiente para formar una hélice α que abarca la bicapa lipídica. Interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos apolares y los grupos acilo graso de los lípidos de la membrana anclan firmemente la proteína a la membrana. Las siete hélices están agrupadas y se orientan en forma no completamente perpendicular al plano de la bicapa patrón que (tal como veremos en el Capítulo 12) es un motivo común en las proteínas de membrana que intervienen en la recepción de señales. Las interacciones hidrofóbicas entre aminoácidos apolares y los grupos acilo grasos de los lípidos de membrana anclan fuertemente la proteína en la membrana.

Las proteínas de membrana cristalizadas y resueltas (es decir que se ha deducido su estructura molecular) por cristalografía incluyen a menudo moléculas de fosfolípidos que se considera que están posicionados en los cristales en la misma forma que en membranas nativas. Gran parte de estas moléculas de fosfolípidos se encuentran en la superficie de la proteína, con sus grupos de cabeza interaccionando con residuos aminoácidos polares en las interfases agua-membrana interior y exterior mientras que las cadenas laterales están asociadas con residuos apolares. Estos **lípidos anulares** forman una envoltura en bicapa (annulus) alrededor de la proteína, que está orientada aproximadamente de la forma que sería de esperar para los fosfolípidos en una bicapa **(Fig. 11–10)**. En las interfases entre monómeros de proteínas formadas por múltiples subunidades se encuentran otros fosfolípidos en donde forman un "sello graso". Además, otros están incrustados profundamente dentro de

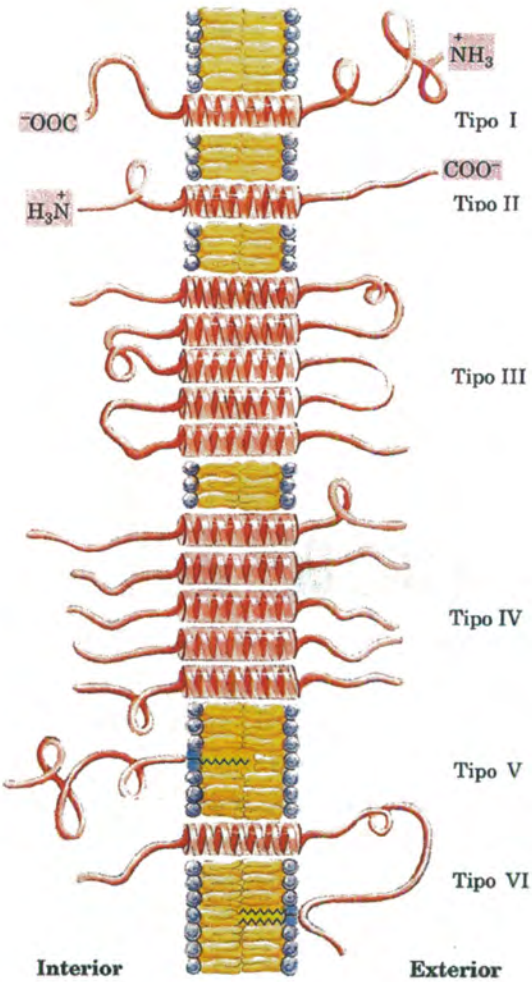


FIGURA 11–8 Proteínas integrales de membrana. Para proteínas conocidas de la membrana plasmática, las relaciones espaciales de los dominios proteicos con la bicapa lipídica se agrupan en seis categorías. Los tipos I y II tienen sólo una hélice transmembrana; el dominio amino-terminal está en el exterior de la célula en las proteínas del tipo I y en el interior en las del tipo II. Las proteínas del tipo III tienen múltiples hélices transmembrana en un único polipéptido. En las proteínas del tipo IV, los dominios transmembrana de varios polipéptidos diferentes se unen para formar un canal a través de la membrana. Las proteínas del tipo V se unen a la bicapa principalmente por lípidos unidos covalentemente (véase la Fig. 11–14), y las proteínas del tipo VI tienen tanto hélices transmembrana como anclajes lipídicos (GPI).

En esta figura, y en otras a lo largo del libro, representamos segmentos de proteína transmembrana en sus conformaciones más probables: como hélices α de seis a siete vueltas. A veces estas hélices se muestran simplemente como cilindros. Como se conocen relativamente pocas proteínas de membrana por cristalografía de rayos X, nuestra representación de los dominios extramembrana es arbitraria y no necesariamente a escala.

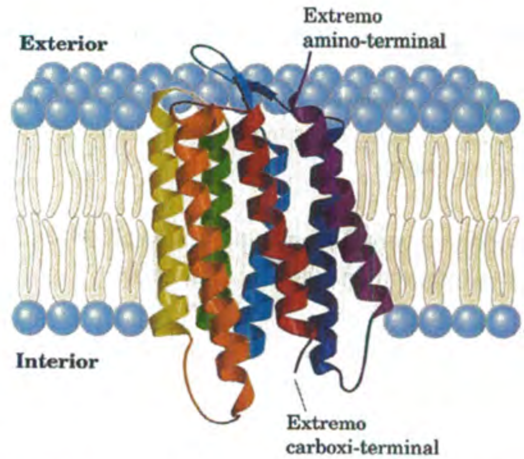


FIGURA 11–9 Bacteriorrodopsina, una proteína que abarca la membrana. (PDB ID 2AT9) La cadena polipeptídica sencilla se pliega en siete hélices α hidrofóbicas, cada una de las cuales atraviesa la bicapa lipídica de forma aproximadamente perpendicular al plano de la membrana. Las siete hélices transmembrana están agrupadas, y el espacio alrededor y entre ellas se llena con las cadenas acilo de los lípidos de membrana. El retinal, un pigmento que absorbe luz (véase la Fig. 10–21), está sepultado muy en el interior de la membrana en contacto con varios de los segmentos helicoidales (no mostrados). Las hélices están coloreadas para corresponder con la gráfica hidropática de la Figura 11–11b.

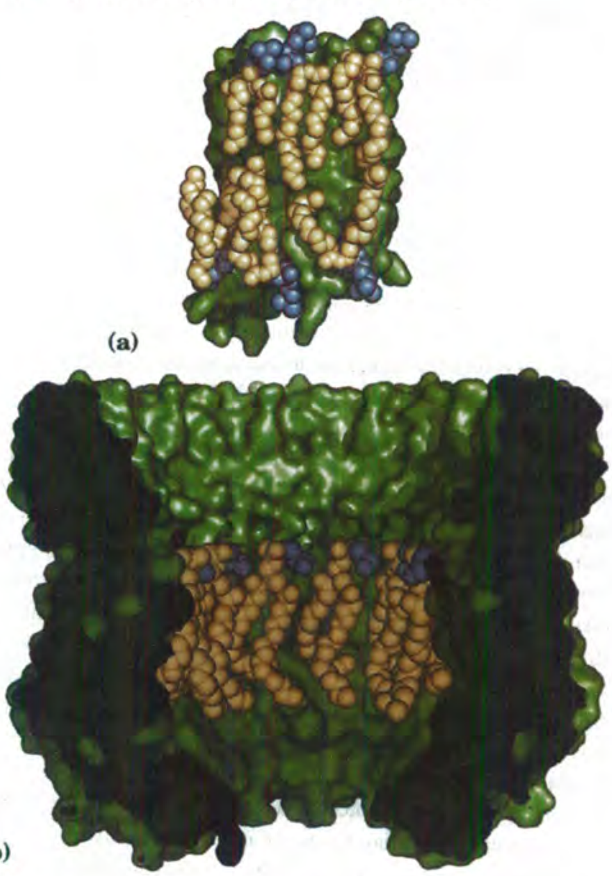


FIGURA 11–10 Anillo lipídico asociado con dos proteínas integrales de membrana. **(a)** La estructura cristalina de la acuaporina de oveja (PDB ID 2B6O), un canal de agua transmembrana, incluye una capa de fosfolípidos situados con sus grupos de cabeza (azul) en las posiciones esperadas en las superficies interna y externa de la membrana y con sus cadenas acilo hidrofóbicas (dorado) íntimamente asociadas con la superficie de la proteína expuesta a la bicapa. El lípido forma un "sello graso" alrededor de la proteína, la cual se representa como una superficie verde. **(b)** La estructura cristalina del complejo proteico integral F_o de la Na^+ ATPasa de tipo V de *Enterococcus hirae* (PDB ID 2BL2) tiene 10 subunidades idénticas, cada una de ellas con cuatro hélices transmembrana que rodean una cavidad central rellena con fosfatidilglicerol (PG). Aquí se han cortado y eliminado cinco de las subunidades para poner de manifiesto las moléculas de PG asociadas con cada subunidad alrededor del interior de esta estructura.

una proteína de membrana, a menudo con sus grupos de cabeza muy por debajo del plano de la bicapa. Por ejemplo, la succinato deshidrogenasa (Complejo II, presente en la mitocondria; véase la Fig. 19–10) tiene varias moléculas de fosfolípido profundamente incrustadas.

Puede predecirse a veces la topología de una proteína integral de membrana a partir de su secuencia

Determinar la estructura tridimensional de una proteína de membrana, o sea, su topología, es, generalmente, mucho más difícil que determinar su secuencia aminoacídica, ya sea directamente o por secuenciación de su gen. Se conocen miles de secuencias de proteínas de membrana, pero se han establecido relativamente pocas estructuras tridimensionales por cristalografía de rayos X o espectroscopia RMN. La presencia de secuencias continuas de más de 20 residuos hidrofóbicos en una proteína de membrana se toma generalmente como prueba de que tales secuencias atraviesan la bicapa lipídica, actuando como anclas hidrofóbicas o formando canales transmembrana. Virtualmente todas las proteínas integrales tienen al menos una de estas secuencias. La aplicación de esta lógica a secuencias genómicas completas conduce a la conclusión de que, en muchas especies, entre el 20% y el 30% de todas las proteínas son proteínas integrales de membrana.

¿Qué podemos predecir sobre la estructura secundaria de las porciones de las proteínas integrales de membrana que abarcan la bicapa? Una secuencia α-helicoidal de 20 a 25 residuos es lo suficientemente larga como para abarcar el grosor (30 Å) de la bicapa lipídica; recuerde que la longitud de una hélice α es de 1,5 Å (0,15 nm) por residuo aminoácido. Una cadena polipeptídica rodeada de lípidos, sin moléculas de agua con las que formar enlaces de hidrógeno, tiende a formar hélices α u hojas β, en las que se maximizan los enlaces de hidrógeno intracatenarios. Si las cadenas laterales de todos los aminoácidos en una hélice son apolares, las interacciones hidrofóbicas con el entorno lipídico estabilizan aun más la hélice.

Varios métodos sencillos de análisis de secuencia de aminoácidos proporcionan una predicción de estructura secundaria bastante precisa para las proteínas transmembrana. La polaridad relativa de cada aminoácido se determina experimentalmente midiendo la variación de energía libre que se produce cuando la cadena lateral del residuo pasa de un disolvente hidrofóbico a agua. Esta variación de energía libre de transferencia, que se puede expresar como un **índice hidropático** (véase la Tabla 3–1), va desde ser muy exergónica para residuos muy polares o cargados a muy endergónica para residuos con cadenas laterales aromáticas o hidrocarbonadas alifáticas. El índice hidropático global (hidrofobicidad) de una secuencia de aminoácidos se calcula sumando las energías libres de transferencia de los residuos en la secuencia. Para localizar segmentos en una secuencia polipeptídica con el potencial para abarcar la membrana, se calculan los índices hidropáticos de segmentos sucesivos (llamados ventanas) de un tamaño determinado que oscila entre 7 y 20 residuos. Para una ventana de 7 residuos, por ejemplo, los índices para los residuos del 1 al 7, del 2 al 8, del 3 al 9, etc., se representan tal como se indica en la **Figura 11–11** (se muestra el índice para el residuo intermedio en cada ventana, el 4 por ejemplo en la ventana 1–7). Una región con más de 20 residuos con alto índice hidropático es, presumiblemente, un segmento transmembrana. Cuando las secuencias de proteínas de membrana de estructura tridimensional conocida se analizan de esta manera, se observa una buena correspondencia entre las predicciones y los segmentos que se sabe que abarcan la membrana. Los análisis hidropáticos predicen un solo segmento hidrofóbico en hélice para la glucoforina (Fig. 11–11a) y siete segmentos transmembrana para la bacteriorrodopsina (Fig. 11–11b), en concordancia con los estudios experimentales.

En base a sus secuencias de aminoácidos y los gráficos hidropáticos, se cree que muchas de las proteínas de transporte descritas en este capítulo tienen múltiples regiones helicoidales que atraviesan la membrana, es decir que pertenecen al grupo III o IV de proteínas integrales (Fig. 11–8). Cuando las predicciones son consistentes con los estudios químicos de localización de proteínas (tales como los descritos anteriormente para la glucoforina o la bacteriorrodopsina), la suposición que las regiones hidrofóbicas corresponden a dominios que abarcan la membrana está mucho más justificada.

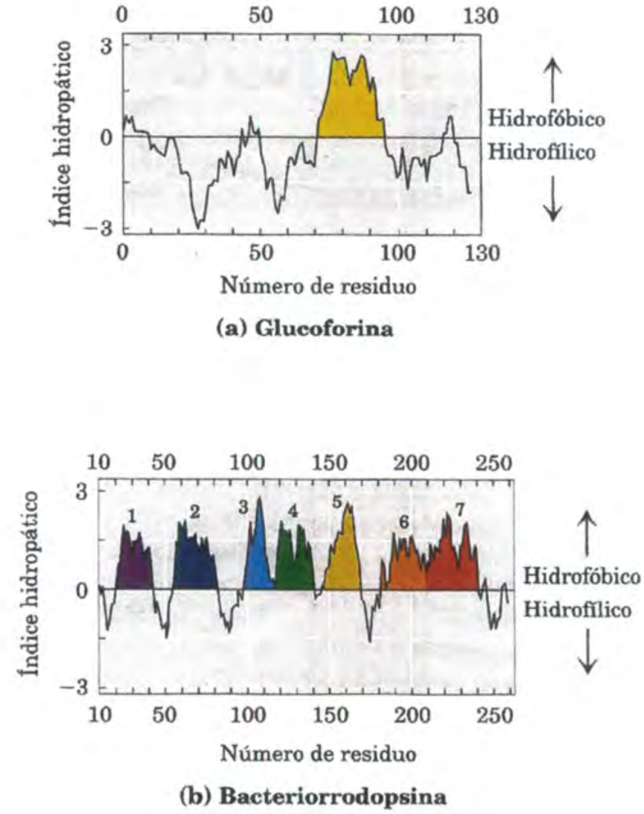


FIGURA 11–11 Gráficas hidropáticas. El índice hidropático (véase la Tabla 3–1) se representa frente al número de residuo para dos proteínas integrales de membrana. El índice hidropático para cada residuo aminoácido en una secuencia de longitud definida (llamada ventana) se utiliza para calcular la hidropatía promedio de los residuos en esta ventana. El eje horizontal muestra el número de residuo de la mitad de la ventana. **(a)** La glucoforina de eritrocitos humanos tiene una única secuencia hidrofóbica entre los residuos 75 y 93 (amarillo); compare esto con la Figura 11–7. **(b)** La bacteriorrodopsina, de la que se sabe por estudios físicos independientes que tiene siete hélices transmembrana (véase la Fig. 11–9), tiene siete regiones hidrofóbicas. Observe, sin embargo, que la gráfica hidropática es ambigua en la región de los segmentos 6 y 7. La cristalografía de rayos X ha confirmado que esta región tiene dos segmentos transmembrana.

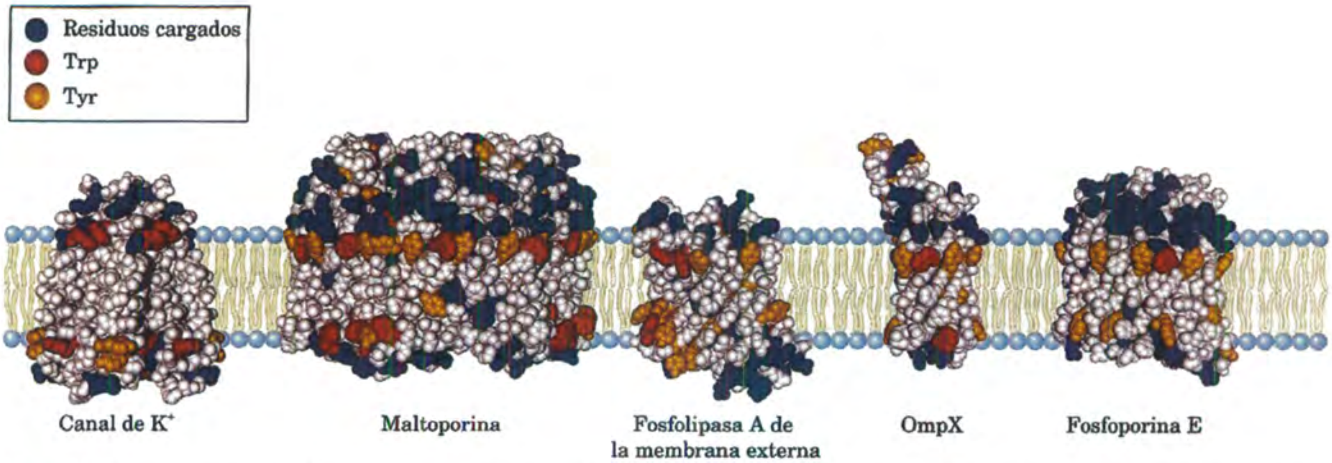


FIGURA 11–12 Agrupamiento de residuos Tyr y Trp de proteínas de membrana en la interfase agua-lípido. Se conocen las estructuras detalladas de estas cinco proteínas integrales de membrana a partir de estudios cristalográficos. El canal de K^+ (PDB ID 1BL8) es de la bacteria *Streptomyces lividans* (véase la Fig. 11–48); la maltoporina (PDB ID 1AF6), la fosfolipasa A de la membrana externa (PDB ID 1QD5), OmpX (PDB ID 1QJ9) y la fosfoporina E (PDB ID 1PHO) son proteínas de la membrana externa de *E. coli*. Los residuos de Tyr (naranja) y Trp (rojo) se encuentran predominantemente en el punto en que las regiones apolares de las cadenas acilo se encuentran con la región de los grupos de cabeza polares. Los residuos cargados (Lys, Arg, Glu, Asp; mostrados en azul) se encuentran casi exclusivamente en las fases acuosas.

Otra característica notable de muchas proteínas transmembrana de estructura conocida es la presencia de residuos Tyr y Trp en la interfase entre lípido y agua **(Fig. 11-12)**. Las cadenas laterales de estos residuos sirven, aparentemente, como anclas de la interfase de la membrana, capaces de interaccionar simultáneamente con la fase lipídica central y con las fases acuosas a ambos lados de la membrana. Otra generalización acerca de la localización de aminoácidos con respecto a la bicapa es la **regla de positivo en el interior:** los residuos de Lys, His y Arg cargados positivamente de las proteínas de membrana se encuentran más frecuentemente en el lado citoplasmático de las membranas.

No todas las proteínas integrales de membrana están formadas por hélices α transmembrana. Otro motivo estructural también común en las proteínas de membrana es el **barril β** (véase la Fig. 4–17b), en el que 20 o más segmentos transmembrana forman hojas β que recubren la parte interior de un cilindro **(Fig. 11–13)**. Los mismos factores que favorecen la formación de hélices α en el interior hidrofóbico de una bicapa lipídica también estabilizan los barriles β: cuando no hay moléculas de agua disponibles para formar enlaces de hidrógeno con el oxígeno y el nitrógeno del enlace peptídico, la formación máxima de puentes de hidrógeno intracatenarios da lugar a la conformación más estable. Las hojas β planas no maximizan estas interacciones por lo que no se encuentran generalmente en el interior de la membrana; los barriles β permiten todos los enlaces de hidrógeno posibles y son, aparentemente, frecuentes en las proteínas de membrana. Las **porinas,** proteínas que permiten el paso de ciertos solutos polares a través de la membrana externa de bacterias gram-negativas como, por ejemplo, *E. coli*, presentan muchos barriles β de múltiples cadenas que forran el paso transmembrana polar.

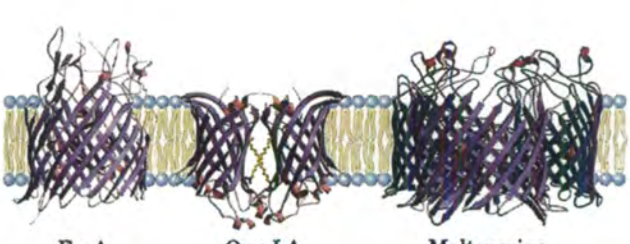


FIGURA 11–13 Proteínas de membrana con estructura en barril β. Se muestran tres proteínas de la membrana externa de *E. coli* vistas desde el plano de la membrana. FepA (PDB ID 1FEP), que interviene en la captación de hierro, tiene 22 cadenas β que abarcan la membrana. OmpLA (procedente de PDB ID 1QD5), una fosfolipasa, es un barril β de 12 cadenas que se encuentra en forma de dímero en la membrana. La maltoporina (PDB ID 1MAL), un transportador de maltosa, es un trímero; cada monómero está constituido por 16 cadenas β.

Un polipéptido es más extendido en la conformación β que en una hélice α son necesarios entre 7 y 9 residuos en una conformación α para atravesar la membrana. Recuerde que en la conformación β, las cadenas laterales se alternan a uno y otro lado de la hoja (véase la Fig. 4–6). En las cadenas β de las proteínas de membrana, cada segundo residuo del segmento transmembrana es hidrofóbico e interacciona con la bicapa lipídica; en la interfase lípido-proteína es frecuente encontrar residuos aromáticos. Los demás residuos pueden ser o no hidrofílicos. La gráfica hidropática no es útil para predecir segmentos transmembrana en el caso de proteínas con motivos de barril β, pero a medida que aumenta la base de datos de barriles β conocidos es factible hacer predicciones de conformaciones β transmembrana basadas en la secuencia. Por ejemplo, se ha predicho correctamente, por análisis de secuencia, que algunas proteínas de membrana de bacterias gram-negativas (Fig. 11–13) contienen barriles β.

Lípidos unidos covalentemente anclan algunas proteínas de membrana

Algunas proteínas de membrana contienen uno o más lípidos unidos covalentemente, que pueden ser de varios tipos: ácidos grasos de cadena larga, isoprenoides, esteroles o derivados glu-

cosilados del fosfatidilinositol (GPI; **Fig. 11–14**). El lípido unido proporciona un anclaje hidrofóbico a la proteína que la inserta en la bicapa lipídica y mantiene la proteína en la superficie de la membrana. La fuerza de la interacción hidrofóbica entre una bicapa y una cadena hidrocarbonada simple unida a una proteína es suficiente para anclar la proteína de forma segura, si bien muchas proteínas tienen más de una porción lipídica unida. Otras interacciones, tales como atracciones iónicas entre residuos Lys de la proteína cargados positivamente y grupos de cabezas polares de los lípidos cargados negativamente, contribuyen probablemente a estabilizar la unión. La asociación de estas proteínas unidas a lípidos con la membrana es ciertamente más débil que la asociación de las proteínas integrales de membrana y es, al menos en algunos casos, reversible. Sin embargo, el tratamiento con carbonato alcalino no libera las proteínas unidas por GPI, las cuales son, por tanto, según la definición operacional, proteínas integrales.

Además de unir una proteína a la membrana el lípido unido podría tener una función específica. En la membrana plasmática, proteínas con anclas GPI se presentan exclusivamente en la cara externa y están confinadas dentro de agrupamientos, tal como veremos (pp. 384–386), mientras que otros tipos de proteínas unidas a lípidos (con grupos farnesilo o geranilgeranilo unidos; Fig. 11–14) se encuentran exclusivamente en la cara interior. En las células epiteliales polarizadas (como por ejemplo las células epiteliales del intestino, véase la Fig. 11–44), en las que las superficies apical y basal tienen funciones diferentes, las proteínas unidas por GPI se dirigen específicamente a la superficie apical. La unión de un lípido específico a una proteína de membrana recién sintetizada tiene, por tanto, una función de orientación, dirigiendo la proteína a su correcta localización en la membrana.

RESUMEN 11.1 Composición y arquitectura de las membranas

- Las membranas biológicas definen los límites celulares, dividen las células en compartimientos discretos, organizan secuencias de reacciones complejas y actúan en la recepción de señales y en transformaciones de energía.
- Las membranas se componen de lípidos y proteínas en una combinación variable y determinada para cada especie, tipo de célula y orgánulo. La bicapa lipídica es la unidad estructural básica.
- Las proteínas periféricas de membrana están asociadas débilmente a la membrana por medio de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno o por anclajes de lípidos unidos covalentemente. Las proteínas integrales se asocian fuertemente a las membranas por medio de interacciones hidrofóbicas entre la bicapa lipídica y las cadenas laterales de sus aminoácidos apolares, que están orientadas hacia el exterior de la molécula de proteína. Las proteínas anfitrópicas se asocian reversiblemente con las membranas.

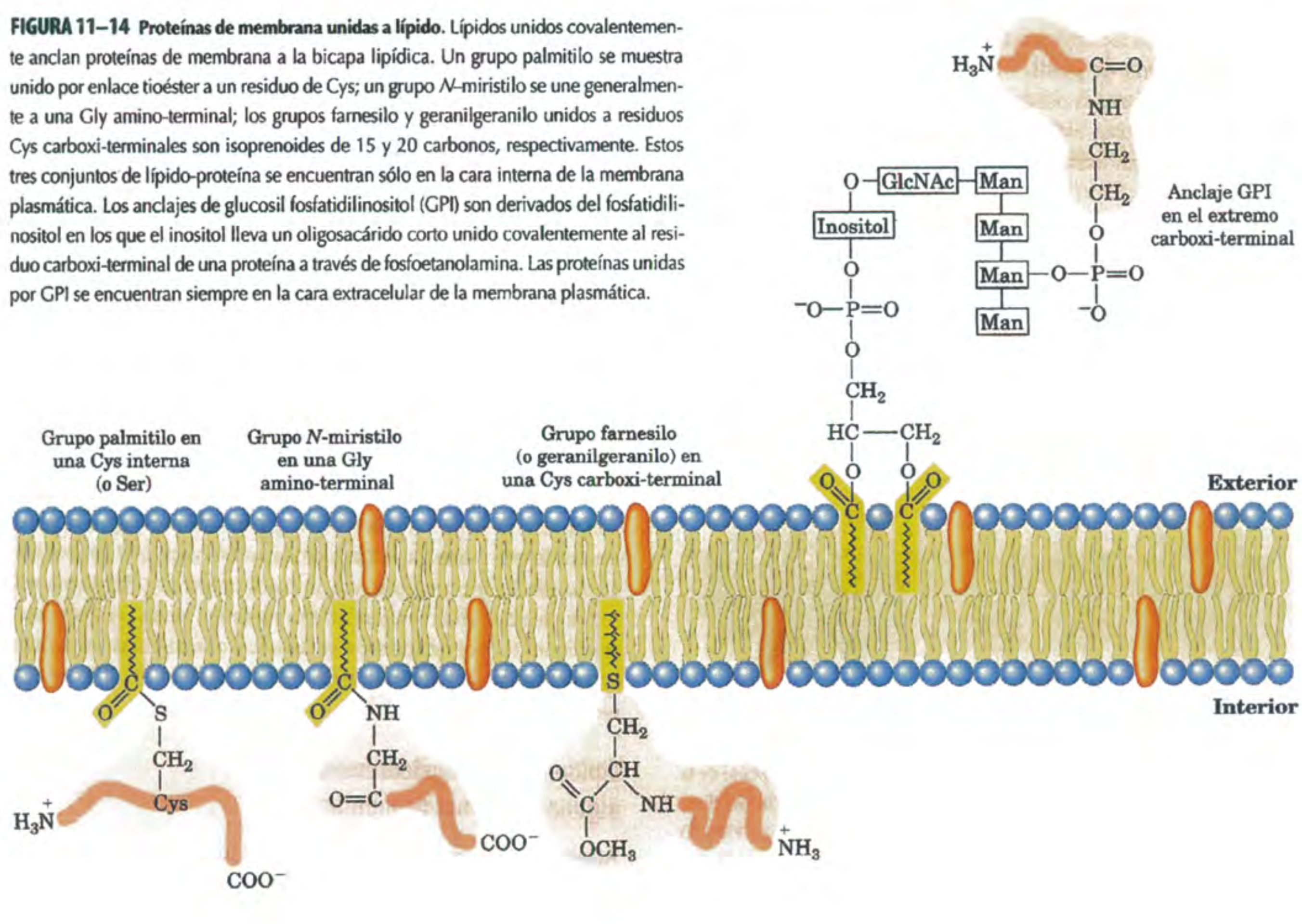


FIGURA 11–14 Proteínas de membrana unidas a lípido. Lípidos unidos covalentemente anclan proteínas de membrana a la bicapa lipídica. Un grupo palmitilo se muestra unido por enlace tioéster a un residuo de Cys; un grupo *N*-miristilo se une generalmente a una Gly amino-terminal; los grupos farnesilo y geranilgeranilo unidos a residuos Cys carboxi-terminales son isoprenoides de 15 y 20 carbonos, respectivamente. Estos tres conjuntos de lípido-proteína se encuentran sólo en la cara interna de la membrana plasmática. Los anclajes de glucosil fosfatidilinositol (GPI) son derivados del fosfatidilinositol en los que el inositol lleva un oligosacárido corto unido covalentemente al residuo carboxi-terminal de una proteína a través de fosfoetanolamina. Las proteínas unidas por GPI se encuentran siempre en la cara extracelular de la membrana plasmática.

- Muchas proteínas de membrana abarcan la bicapa lipídica varias veces, con secuencias hidrofóbicas de, aproximadamente, 20 residuos aminoácidos formando hélices α transmembrana. Los barriles β multicadena son también comunes en las proteínas integrales de membrana bacterianas. Residuos Tyr y Trp de proteínas transmembrana se hallan a menudo en la interfase lípido-agua.
- Los lípidos y las proteínas de las membranas se insertan en la bicapa con orientación específica; así pues, las membranas son estructural y funcionalmente asimétricas. Las glucoproteínas de la membrana plasmática están siempre orientadas con el dominio portador de glúcido en la superficie extracelular.

11.2 Dinámica de las membranas

Una característica notable de todas las membranas biológicas es su flexibilidad, es decir, su capacidad de cambiar de forma sin perder su integridad ni dejar salir sus contenidos. La base de esta propiedad se encuentra en las interacciones no covalentes entre lípidos de la bicapa y los movimientos permitidos a los lípidos individuales, ya que no están unidos entre sí de forma covalente. Analizamos seguidamente la dinámica de las membranas: los movimientos que tienen lugar y las estructuras transitorias permitidas por estos movimientos.

FIGURA 11–15 Dos estados extremos de los lípidos de la bicapa. (a) En el estado paracristalino, o fase de gel, los grupos de cabeza polares están ordenados uniformemente en la superficie y las cadenas acilo están casi quietas y empaquetadas con una geometría regular; **(b)** en el estado líquido desordenado, o estado fluido, las cadenas acilo experimentan mucha moción térmica y no tienen una organización regular. Intermedio entre estos dos extremos se encuentra el estado líquido ordenado, en el que las moléculas de fosfolípidos individuales pueden difundir lateralmente pero los grupos acilo permanecen extendidos y más o menors ordenados.

Los grupos del interior de la bicapa están ordenados en grados diferentes

Aunque la estructura de la bicapa lipídica es bastante estable, las moléculas individuales de fosfolípidos y esteroles tienen una gran libertad de movimiento **(Fig. 11–15)**. La estructura y flexibilidad de la bicapa lipídica depende de los tipos de lípidos presentes y varía con la temperatura. Por debajo de las temperaturas fisiológicas normales los lípidos de la bicapa forman una **fase de gel** semisólida en la que están constreñidos fuertemente todos los tipos de movimiento de las moléculas individuales de lípido; la bicapa es paracristalina (Fig. 11–15a). Por encima de las temperaturas fisiológicas las cadenas hidrocarbonadas individuales de los ácidos grasos están en movimiento constante producido por rotación alrededor de los enlaces carbono-carbono de las largas cadenas laterales acílicas. En este **estado líquido desordenado,** o estado fluido (Fig. 11–15b), el interior de la bicapa es más fluido que sólido y la bicapa es como un mar de lípido en movimiento constante. A temperaturas intermedias (fisiológicas), los lípidos se encuentran en un **estado líquido ordenado;** hay menos moción térmica de las cadenas acilo de la bicapa lipídica, pero aún tiene lugar el movimiento lateral en el plano de la bicapa. Estas diferencias en el estado de la bicapa se observan fácilmente en los liposomas compuestos por un único lípido pero las membranas biológicas contienen muchos lípidos con una gran variedad de cadenas acilo grasas por lo que no muestran cambios de fase abruptos con la temperatura.

A temperaturas fisiológicas (entre unos 20 y 40 °C para un mamífero) los ácidos grasos saturados de cadena larga (tales como 16:0 y 18:0) se empaquetan en una disposición líquida ordenada, pero los giros de los ácidos grasos insaturados (véase la Fig. 10–2) interfieren con este empaquetamiento favoreciendo el estado líquido desordenado. Los grupos acilo graso de cadena corta tienen el mismo efecto. El contenido en esteroles de una membrana (que varía muchísimo con el organismo y el orgánulo; Tabla 11–1) es otro determinante importante del estado lipídico. La estructura plana rígida del núcleo esteroide, insertado entre cadenas laterales de acilo graso, reduce la libertad de las cadenas acilo graso vecinas para moverse por rotación alrededor de sus enlaces carbono-carbono, forzando a las cadenas para que adopten su conformación totalmente extendida. La presencia de esteroles reduce, por consiguiente, la fluidez en el centro de la bicapa favoreciendo de este modo la fase líquida ordenada al tiempo que incrementan el grosor de la hoja lipídica (tal como se describe más adelante).

Las células regulan su composición lipídica de forma que se consigue una fluidez de membrana constante en diversas condiciones de crecimiento. Por ejemplo, cultivadas a baja temperatura, las bacterias sintetizan más ácidos grasos insaturados y menos ácido saturados que cuando se cultivan a temperaturas elevadas (Tabla 11–2). Resultado de este ajuste en la composición lipídica, las membranas de las bacterias cultivadas a altas o bajas temperaturas tienen prácticamente el mismo grado de fluidez.

El movimiento de lípidos transbicapa requiere catálisis

En caso de que tenga lugar, la difusión transbicapa, o "flip-flop" de una molécula de lípido de una capa a otra de la bicapa es muy lenta a temperaturas fisiológicas **(Fig. 11–16a)** en la mayoría de membranas, aunque la difusión lateral *en el plano* de la bica-

TABLA 11–2 Composición de ácidos grasos de las células de *E. coli* cultivadas a diferentes temperaturas

	Porcentaje total de ácidos grasos*			
	10 °C	**20 °C**	**30 °C**	**40 °C**
Ácido mirístico (14:0)	4	4	4	8
Ácido palmítico (16:0)	18	25	29	48
Ácido palmitoleico (16:1)	26	24	23	9
Ácido oleico (18:1)	38	34	30	12
Ácido hidroximirístico	13	10	10	8
Relación insaturados/saturados†	2,9	2,0	1,6	0,38

Fuente: Datos de Marr, A.G. & Ingraham, J.L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **84**, 1260.

*La composición exacta de ácidos grasos depende no sólo de la temperatura de crecimiento sino también de la etapa de crecimiento y de la composición del medio de cultivo.

†Calculada como porcentaje total de 16:1 más 18:1 dividido por el porcentaje total de 14:0 más 16:0. El ácido hidroximirístico se omitió en este cálculo.

pa es muy rápido (Fig. 11–16b). El movimiento transbicapa requiere que un grupo de cabeza polar o cargado abandone su entorno acuoso y se traslade al interior hidrofóbico de la bicapa, proceso que tiene una gran variación positiva de energía libre. Hay, sin embargo, situaciones en las que tal movimiento es esencial. Por ejemplo, en el RE los glicerofosfolípidos de membrana se sintetizan en la superficie citosólica, mientras que los esfingolípidos se sintetizan o modifican en la superficie de la luz. Para ir de su sitio de síntesis al punto final de deposición, estos lípidos han de experimentar difusión flip-flop.

Diversas familias de proteínas, entre las que se encuentran las flipasas, flopasas y escramblasas (Fig. 11–16c), facilitan el movimiento transbicapa de lípidos, proporcionando una ruta que es energéticamente más favorable y mucho más rápida que el movimiento sin catalizar. La combinación de biosíntesis asimétrica de los lípidos de membrana, la difusión flip-flop sin catalizar muy lenta y la presencia de translocadores lipídicos selectivos dependientes de energía, es responsable de la asimetría transbicapa en la composición lipídica mostrada en la Fig. 11–5. Aparte de contribuir a la asimetría en la composición, el transporte de lípidos dependiente de energía a una de las hojas de la bicapa puede ser importante en la generación de la curvatura de la membrana esencial en la gemación de vesículas al crear una gran superficie en un lado de la bicapa.

Las **flipasas** catalizan la translocación de los aminofosfolípidos fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina desde la hoja extracelular a la citosólica de la membrana plasmática, contribuyendo a la distribución asimétrica de los fosfolípidos: fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina principalmente en la hoja citosólica, y esfingolípidos y fosfatidilcolina en la hoja externa. El mantener la fosfatidilserina fuera de la hoja extracelular es importante: su exposición sobre la superficie exterior desencadena la apoptosis (muerte celular programada; véase el Capítulo 12) y su ingestión por parte de los macrófagos portadores de receptores de fosfatidilserina. Las flipasas también actúan en el RE, en donde transportan fosfolípidos recién sintetizados desde su sitio de síntesis en la hoja citosólica a la hoja de la luz. Las flipasas consumen alrededor de un ATP por molécula de fosfolípido translocado y están estructural y funcionalmente relacio-

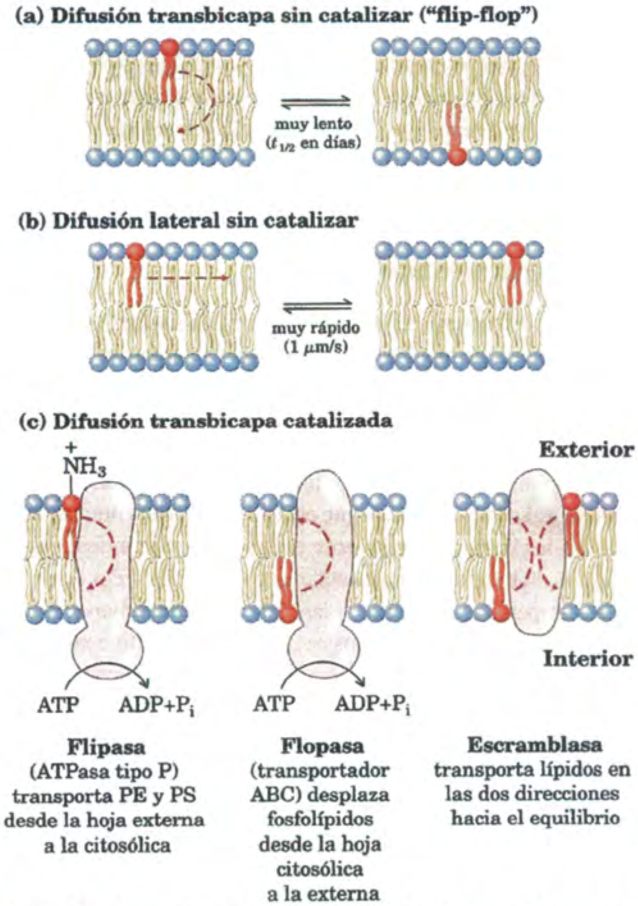


FIGURA 11–16 Movilidad de fosfolípidos individuales en una bicapa. **(a)** El movimiento sin catalizar desde una cara a la otra es muy lento, pero **(b)** la difusión lateral dentro de la hoja es muy rápido y no requiere catálisis proteica. **(c)** Tres tipos de translocadores de fosfolípido de la membrana plasmática. Las flipasas translocan principalmente aminofosfolípidos (fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS)) desde la hoja externa (exoplasmática) a la hoja interna (citosólica); requieren ATP y son miembros de la familia ATPasa de tipo P. Las flopasas transportan fosfolípidos desde la hoja citosólica a la exterior, requieren ATP y son miembros de la familia de transportadores ABC. Las escramblasas equilibran fosfolípidos a través de ambas hojas; no requieren ATP pero son activadas por Ca^{2+}.

nadas con las ATPasas tipo P (transportadores activos) descritas en la p. 396.

Las **flopasas** transportan fosfolípidos de la membrana plasmática desde la hoja citosólica a la hoja extracelular y, al igual que las flipasas, son dependientes de ATP. Las flopasas son miembros de la familia de transportadores ABC descritos en la p. 400, todos los cuales transportan activamente sustratos hidrofóbicos hacia fuera a través de la membrana plasmática. Las **escramblasas** son proteínas que desplazan cualquier fosfolípido de membrana a través de la bicapa a favor de su gradiente de concentración (desde la hoja con una concentración mayor a la hoja con menor concentración); su actividad no depende del ATP. La actividad de la escramblasa lleva a la composición estadística controlada de grupos de cabeza en las dos caras de la bicapa. La actividad aumenta abruptamente con un incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, la cual puede ser resultado de activación celular, lesión celular o apoptosis; tal como se ha indicado anteriormente, la exposición de fosfatidilserina en la superficie exterior marca una célula para la apoptosis e ingestión por parte de los macrófagos. Finalmente, se cree que un grupo de proteínas que actúan principalmente transportando lípidos de fosfatidilinositol a través de las bicapas lipídicas, las proteínas transferidoras de fosfatidilinositol, tienen papeles importantes en la señalización de lípidos y en el tráfico a través de la membrana.

Lípidos y proteínas difunden lateralmente en la bicapa

Las moléculas de lípido individuales pueden trasladarse lateralmente en el plano de la membrana intercambiando su sitio con moléculas lipídicas vecinas, es decir, experimentan movimiento browniano dentro de la bicapa (Fig. 11–16b) que puede ser muy rápido. Una molécula en la cara externa de la membrana plasmática de eritrocito, por ejemplo, puede difundir lateralmente con tal rapidez que puede dar la vuelta completa al eritrocito en segundos. Esta rápida difusión lateral dentro del plano de la bicapa tiende a hacer aleatoria la posición de las moléculas individuales en unos pocos segundos.

Se puede demostrar experimentalmente la difusión lateral mediante la unión de sondas fluorescentes a los grupos de cabeza de lípidos y utilizando la microscopia de fluorescencia para seguir las sondas en función del tiempo **(Fig. 11–17)**. En una de las técnicas se decolora una pequeña región (5 μm^2) de una superficie celular con lípidos marcados con fluorescencia por medio de radiación láser intensa de modo que el trozo irradiado ya no fluoresce cuando se observa a la luz mucho más tenue del microscopio de fluorescencia (no decolorante). Sin embargo, en cuestión de milisegundos la región recupera su fluorescencia ya que moléculas de lípido no decoloradas difunden al trozo decolorado a la vez que moléculas de lípido decoloradas difunden fuera del mismo.

La velocidad de recuperación de la fluorescencia después de la fotodecoloración o **FRAP** (fluorescent recovery after photobleaching) es una medida de la velocidad de difusión lateral de los lípidos. Utilizando la técnica FRAP se ha demostrado que algunos lípidos de membrana difunden lateralmente a una velocidad de hasta 1 μm/s.

Otra técnica, el rastreo de una sola partícula, permite seguir el movimiento de una *única* molécula de lípido en la mem-

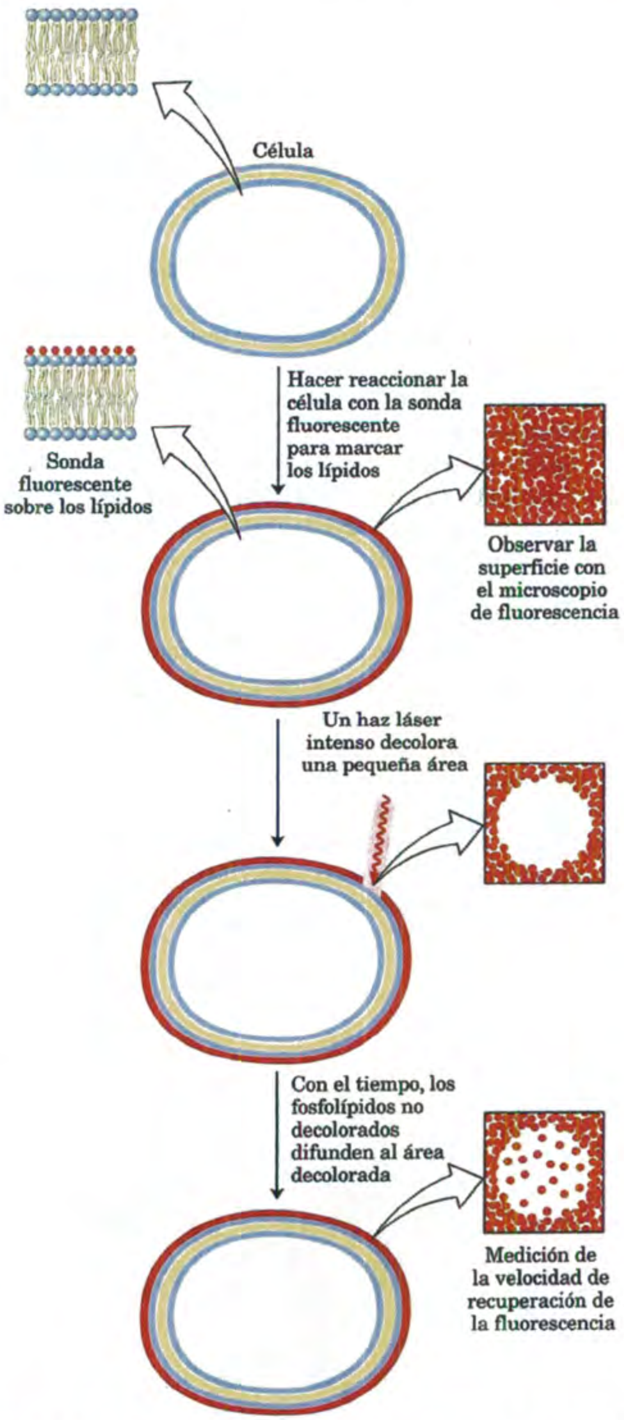


FIGURA 11–17 Medición de las velocidades de difusión lateral de lípidos mediante recuperación de la fluorescencia después de la fotodecoloración (FRAP). Los lípidos de la hoja exterior de la membrana plasmática se marcan mediante una reacción con una sonda fluorescente impermeable a la membrana (rojo), de manera que la superficie queda marcada de manera uniforme cuando se observa al microscopio de fluorescencia. Se decolora una pequeña área por irradiación con un haz láser intenso, con lo que tal área deja de ser fluorescente. Con el paso del tiempo, moléculas de lípido marcadas difunden hacia la región decolorada y vuelve a ser fluorescente. A partir de la recuperación de la fluorescencia en función del tiempo puede determinarse el coeficiente de difusión del lípido marcado. Las velocidades de difusión son normalmente elevadas; un lípido que se desplace a esta velocidad podría circunnavegar *E. coli* en un segundo. (El método FRAP también se puede utilizar para medir la difusión lateral de proteínas de membrana.)

brana plasmática en una escala de tiempo mucho menor. Los resultados de estos estudios confirman la rápida difusión lateral dentro de regiones concretas pequeñas de la superficie celular y demuestran que el movimiento de una de estas regiones a una región vecina ("fusión a saltos") está inhibido; los lípidos de membrana se comportan como si estuviesen cercados por vallas que sólo pueden cruzar ocasionalmente por difusión a saltos **(Fig. 11–18)**.

Muchas proteínas de membrana parecen flotar en un mar de lípidos. Al igual que los lípidos de membrana estas proteínas tienen libertad para difundir lateralmente en el plano de la bicapa y están en movimiento constante, tal como se demuestra mediante la técnica FRAP con proteínas de superficie con marcadores fluorescentes.

Algunas proteínas de membrana se asocian formando grandes agregados ("parches") en la superficie de una célula u orgánulo, en que las moléculas de proteína individuales no se mueven unas respecto a las otras; por ejemplo, los receptores de acetilcolina forman densos parches casi cristalinos en las membranas plasmáticas neuronales de las sinapsis. Otras proteínas de membrana están ancladas a estructuras internas que evitan su libre difusión. En la membrana del eritrocito, tanto la glucoforina como el intercambiador de bicarbonato y cloruro (p. 395) están ligados a la espectrina, una proteína filamentosa del citoesqueleto **(Fig. 11–19)**. Una explicación posible del patrón de difusión lateral de las moléculas de lípido mostrado en la Figura 11-18 es que las proteínas de membrana inmovilizadas por su asociación con la espectrina forman las "vallas" que definen las regiones de movimiento lipídico relativamente no restringido.

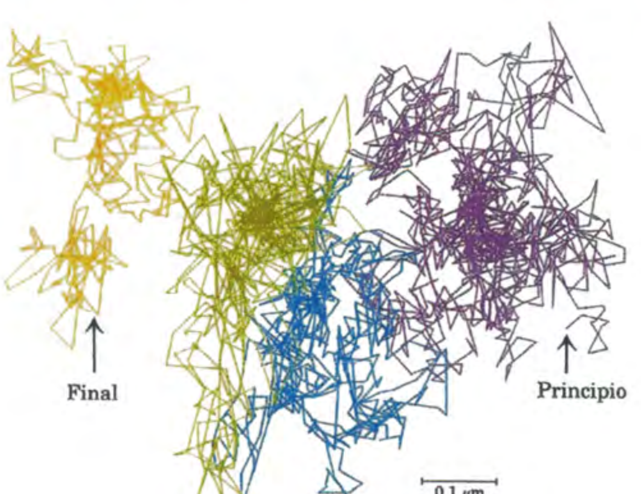


FIGURA 11–18 Difusión a saltos de moléculas de lípido individuales. El movimiento de una única molécula de lípido fluorescente en una superficie celular se registra en vídeo por microscopia de fluorescencia, con una resolución en el tiempo de 25 μs (equivalente a 40.000 marcos/s). El trazo que se muestra en la figura representa una molécula seguida durante 56 ms (2.250 marcos); el trazo empieza en el área púrpura y continúa a través de las áreas azul, verde y naranja. El patrón de movimiento indica una difusión rápida dentro de una región confinada (alrededor de 250 nm de diámetro, señalada por un solo color), con saltos ocasionales a una región adyacente. Este descubrimiento sugiere que los lípidos se encuentran encerrados por vallas moleculares que pueden saltar de vez en cuando.

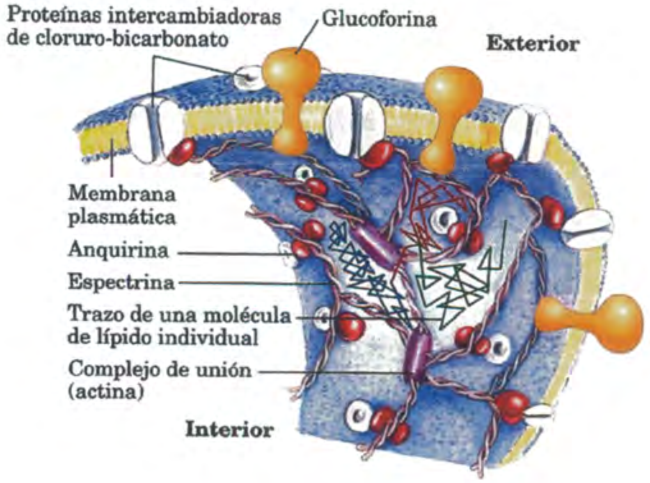


FIGURA 11–19 Movilidad restringida del intercambiador cloruro-bicarbonato del eritrocito. Las proteínas abarcan la membrana y se ligan a la proteína citoesquelética espectrina mediante otra proteína, la anquirina, limitando sus movilidades laterales. La anquirina está anclada a la membrana por una cadena lateral de palmitilo unida covalentemente (véase la Fig. 11–14). La espectrina, una proteína larga y filamentosa, se entrecruza en complejos funcionales de unión que contienen actina. Una red de moléculas de espectrina entrecruzadas unidas a la cara citoplasmática de la membrana plasmática estabiliza la membrana contra deformaciones. Esta red de proteínas de membrana ancladas puede ser el "corral" sugerido por el experimento de la Figura 11–18; los rastros de lípido aquí mostrados están confinados a regiones definidas por las proteínas de membrana ligadas.

Los esfingolípidos y el colesterol se agrupan conjuntamente en balsas de membrana

Hemos visto que la difusión de los lípidos de membrana de una cara de la bicapa a la otra es muy lenta a menos que esté catalizada y que las diferentes especies de lípido de la membrana plasmática están distribuidas de manera asimétrica en las dos hojas de la bicapa (Fig. 11–5). Incluso dentro de una misma hoja, la distribución de lípidos no es aleatoria. Los glucoesfingolípidos (cerebrósidos y gangliósidos), que contienen normalmente ácidos grasos saturados de cadena larga, forman agrupaciones transitorias en la hoja externa que excluye prácticamente los glicerofosfolípidos, los cuales contienen habitualmente un grupo acilo graso insaturado y un grupo acilo graso saturado más corto. Los grupos acilo saturados largos de los esfingolípidos pueden formar asociaciones más compactas y estables con el largo sistema anular del colesterol que las cadenas más cortas y, a menudo insaturadas, de los fosfolípidos. Los **microdominios** de colesterol-esfingolípidos de la hoja externa de la membrana plasmática, visible por microscopia de fuerza atómica (Recuadro 11–1), son ligeramente más gruesos y más ordenados (menos fluidos) que los microdominios vecinos ricos en fosfolípidos y son más difíciles de disolver con detergentes no iónicos; se comportan como **balsas** de esfingolípido de estructura líquida ordenada a la deriva en un océano de fosfolípidos de estructura líquida desordenada (**Fig. 11–20**, p. 386).

Estas balsas de lípidos contienen una cantidad elevada de dos clases de proteínas integrales de membrana: las que están ancladas a la membrana mediante dos ácidos grasos saturados de cadena larga unidos de forma covalente (dos grupos palmitilo o un grupo palmitilo y uno miristilo) y las que están unidas

RECUADRO 11–1 MÉTODOS Microscopia de fuerza atómica para ver proteínas de membrana

En la microscopia de fuerza atómica (AFM), se desplaza la punta fina de una sonda microscópica unida a un brazo de palanca flexible a través de una superficie irregular tal como una membrana (Fig. 1). Las interacciones electrostáticas y de van der Waals entre la punta y la muestra producen una fuerza que desplaza la sonda arriba y abajo (en la dimensión z) a medida que encuentra colinas y valles en la muestra. Un rayo láser reflejado desde el brazo de palanca detecta mociones de tan sólo 1 Å. En un tipo de microscopio de fuerza atómica se mantiene constante la fuerza sobre la sonda (en relación a una fuerza estándar, del orden de piconewtons) mediante un circuito de retroalimentación que hace que la plataforma que sostiene la muestra suba o baje para mantener la fuerza constante. Una serie de barridos en las dimensiones x e y (el plano de la membrana) proporciona un mapa de curvas de nivel tridimensional de la superficie con una resolución próxima a la escala atómica (0,1 nm en la dimensión vertical y 0,5 a 1,0 nm en las dimensiones laterales). Las balsas de membrana mostradas en la Figura 11–20b se obtuvieron con esta técnica.

En casos favorables, puede utilizarse la AFM para estudiar moléculas proteicas individuales de una membrana. Las moléculas individuales de la bacteriorrodopsina (véase la Fig. 11–9) de las membranas púrpura de la bacteria *Halobacterium salinarum* se ven como estructuras muy regulares (Fig. 2a). Cuando se superponen una serie de imágenes de unidades individuales con la ayuda de un ordenador, las partes reales de la imagen se refuerzan entre sí y se elimina el ruido de fondo de las imágenes individuales, obteniéndose una imagen de alta resolución de la proteína (inserto de la Fig. 2a). La AFM de la acuaporina purificada de *E. coli*, reconstituida en bicapas lipídicas y vista como si se mirase desde el exterior de una célula, muestra los detalles finos de los dominios periplasmáticos de la proteína (Fig. 2b). La AFM también revela que F_o, el rotor impulsado por protones de la ATP sintasa del cloroplasto (p. 760), está compuesto por muchas subunidades (14 en la Fig. 2c) dispuestas en un círculo.

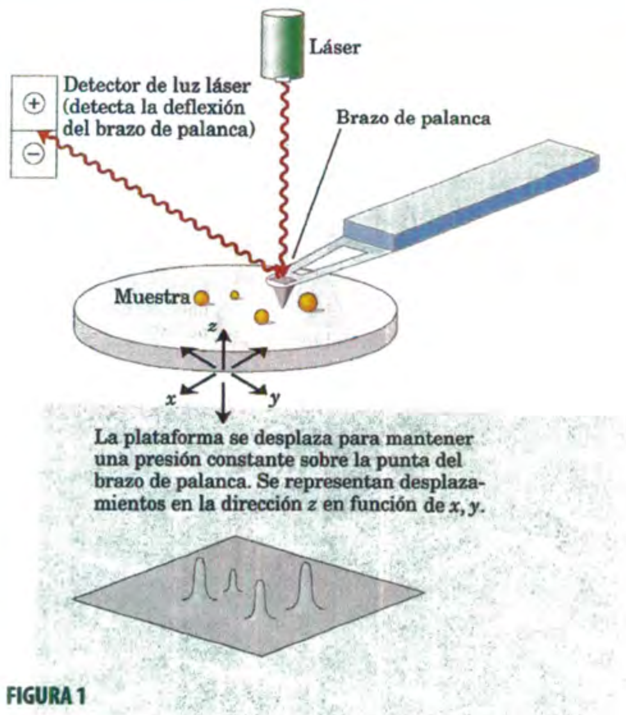


FIGURA 1

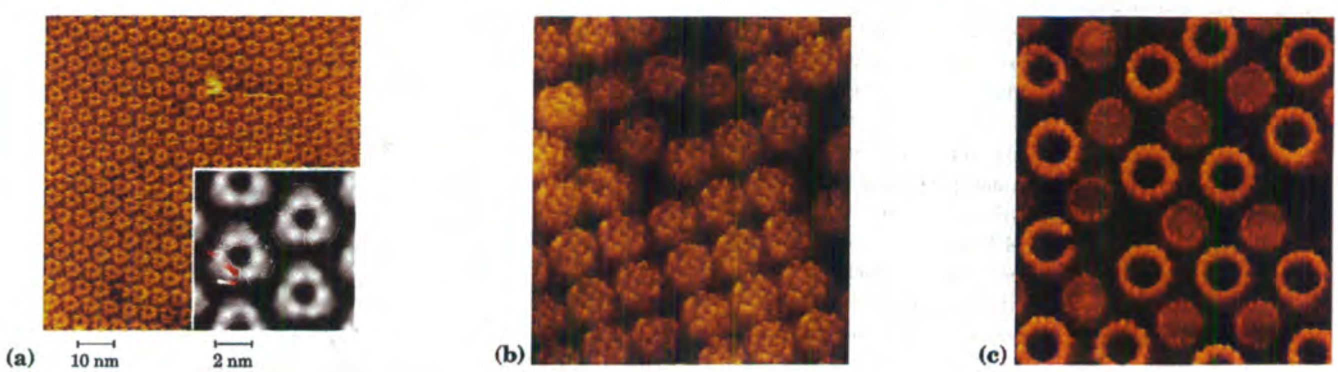


FIGURA 2

por GPI (Fig. 11–14). Probablemente estas anclas lipídicas, lo mismo que las cadenas acílicas de los esfingolípidos, forman asociaciones más estables con el colesterol y los grupos acílicos largos de las balsas que con los fosfolípidos que las rodean. (Es de notar que otras proteínas unidas a lípidos, las que contienen grupos isoprenilo tales como el farnesilo unidos de forma covalente, no se asocian preferentemente con la hoja externa de las balsas de esfingolípido/colesterol (Fig. 11–20a).) Los dominios "balsa" y "mar" de la membrana plasmática no están separados de manera rígida; las proteínas de membrana pueden desplazarse hacia dentro y hacia fuera de las balsas de lípido en una escala de tiempo de segundos. Pero en la escala de tiempo más corta (microsegundos) más adecuada para muchos procesos bioquímicos en los que intervienen membranas, muchas de estas proteínas residen principalmente en la balsa.

Se puede calcular la fracción de superficie celular ocupada por balsas a partir de la fracción de membrana plasmática que resiste la solubilización por detergentes que, en algunos casos, puede llegar a ser del 50%: las balsas cubren la mitad del océano (Fig. 11–20b). Medidas indirectas en cultivos de fibroblastos sugieren que una balsa individual tiene un diámetro de 50 nm, lo que corresponde a un parche con unos cuantos miles de esfingo-

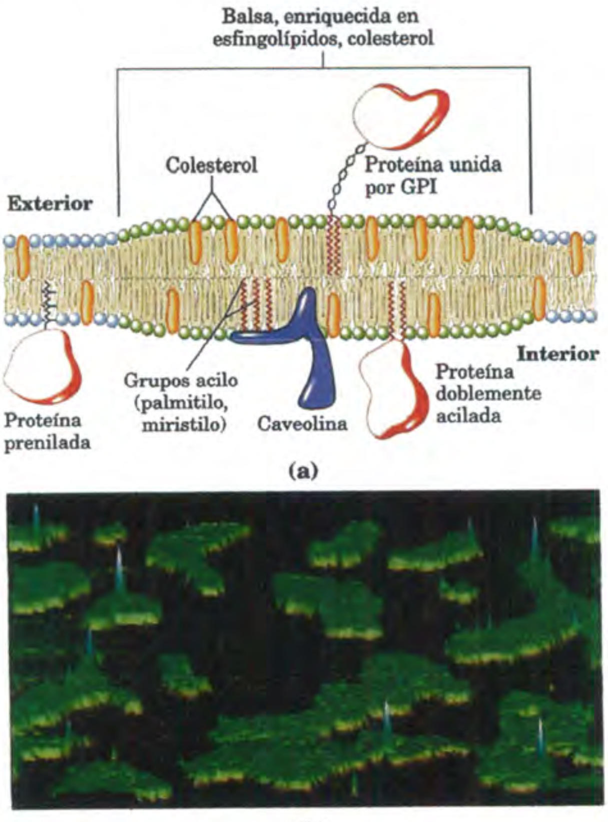


FIGURA 11–20 Microdominios (balsas) en la membrana. **(a)** Asociaciones estables de esfingolípidos y colesterol en la hoja externa producen un microdominio, ligeramente más grueso que las otras regiones de la membrana, que está enriquecido con tipos específicos de proteínas de membrana. Las proteínas unidas por GPI se encuentran normalmente en la hoja externa de estas balsas mientras que proteínas con uno o varios grupos acilo de cadena larga unidos covalentemente son frecuentes en la hoja interna. La caveolina se encuentra de modo preferente en balsas curvadas hacia el interior denominadas caveolas (véase la Fig. 11–21). Las proteínas con grupos prenilo unidos (tales como Ras; véase el Recuadro 12–2) tienden a ser excluidas de las balsas. **(b)** En esta membrana artificial, reconstituida (en una superficie de mica) a partir de colesterol, fosfolípido sintético (dioleilfosfatidilcolina) y la proteína unida por GPI fosfatasa alcalina de placenta, el mayor espesor de las regiones de balsa pueden visualizarse mediante microscopia de fuerza atómica (véase el Recuadro 11–1). Las balsas sobresalen de un océano de bicapa lipídica (la superficie negra es la parte más alta de la monocapa superior); los picos agudos representan las proteínas unidas por GPI. Observe que estos picos se encuentran casi exclusivamente en las balsas.

La **caveolina** es una proteína integral de membrana con dos dominios globulares conectados por un dominio hidrofóbico en forma de horquilla que une la proteína a la hoja citoplasmática de la membrana plasmática. El anclaje a la membrana se refuerza con tres grupos palmitilo unidos al dominio globular carboxi-terminal. La caveolina (de hecho una familia de caveolinas relacionadas) une colesterol en la membrana y la presencia de caveolina fuerza a la bicapa lipídica asociada a curvarse hacia dentro, formando **caveolas** ("pequeñas cuevas") en la superficie de la célula **(Fig. 11–21)**. Las caveolas son balsas especiales: en ellas intervienen *ambas* hojas de la bicapa (la hoja citoplasmática, de la que se proyectan los dominios globulares de la caveolina y la hoja extracelular, una balsa típica de esfingolípidos/colesterol con proteínas asociadas ancladas por GPI). Las caveolas intervienen en diversas funciones celulares, entre las que se incluyen el tráfico a través de membranas dentro de las células y la transducción de señales externas en respuestas celulares. Los receptores de la insulina y de otros factores de crecimiento, así como ciertas proteínas de unión a GTP y proteína quinasas asociadas con la señalización transmembrana, parecen estar localizados en lípidos y quizá 10 a 50 proteínas de membrana. Debido a que la mayoría de células expresan más de 50 clases diferentes de proteínas de la membrana plasmática, es probable que una sola balsa contenga sólo un subconjunto de proteínas de membrana y que esta segregación de proteínas de membrana sea funcionalmente significativa. Para un proceso en el que interviene la interacción de dos proteínas de membrana, su presencia en una misma balsa aumentaría grandemente la probabilidad de su colisión. Ciertos receptores de membrana y proteínas de señalización, por ejemplo, parecen estar segregados en balsas de membrana. Se han hecho experimentos que demuestran que se puede interferir en la señalización a través de estas proteínas mediante manipulaciones que eliminan el colesterol de la membrana plasmática y destruyen las balsas de lípidos.

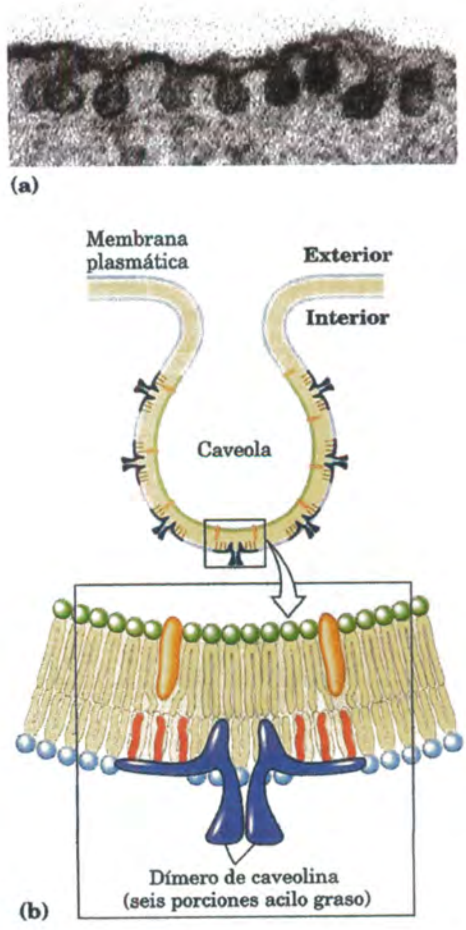


FIGURA 11–21 La caveolina fuerza la curvatura hacia dentro de las membranas. Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática, tal como se ven en **(a)** una micrografía electrónica de una superficie de adipocito marcada con un marcador denso en electrones. **(b)** Cada monómero de caveolina tiene un dominio central hidrofóbico y tres grupos acilo de cadena larga (rojo) que mantienen la molécula en el interior de la membrana plasmática. Cuando se concentran en una pequeña región (una balsa) varios dímeros de caveolina, fuerzan una curvatura de la bicapa lipídica, formando una caveola. Las moléculas de colesterol de la bicapa se muestran en naranja.

balsas y, quizá, en caveolas. En el Capítulo 12 se tratan algunos papeles posibles de las balsas en la señalización.

La curvatura y la fusión de membranas son cruciales en muchos procesos biológicos

La caveolina no está sola en su capacidad de inducir curvatura en las membranas. Los cambios de curvatura son cruciales en una de las propiedades más notables de las membranas biológicas: su capacidad para fusionarse con otras membranas sin perder su continuidad. Aunque las membranas son estables ello no quiere decir que sean estáticas. Dentro del sistema endomembranoso eucariótico (que incluye la membrana nuclear, el retículo endoplasmático, Golgi y varias vesículas pequeñas) hay una reorganización constante de los compartimientos membranosos. Hay pequeñas vesículas que brotan del retículo endoplasmático para llevar lípidos y proteínas recién sintetizados a los restantes orgánulos y a la membrana plasmática. En la exocitosis, endocitosis, división celular, fusión de las células del huevo y esperma y la entrada de un virus con envuelta membranosa dentro de la célula huésped tiene lugar la reorganización de la membrana en la que la operación fundamental es la fusión de dos segmentos membranosos sin pérdida de continuidad (**Fig. 11–22**). La mayoría de estos procesos empiezan con un incremento local de la curvatura de la membrana. En la **Figura 11–23** se muestran tres mecanismos para inducir la curvatura de la membrana. Una proteína que ya es intrínsecamente curvada puede forzar la curvatura de una bicapa al unirse a ella; la energía de fijación proporciona la fuerza motriz para incrementar la curvatura de la membrana. Alternativamente, muchas unidades de una proteína de armazón puede unirse en complejos supramoleculares curvados y estabilizar curvas que se forman espontáneamente en una bicapa. Finalmente, una proteína puede insertar una o más hélices hidrofóbicas en un lado de la bicapa, expandiendo su área en relación con la de la otra cara y forzando así la curvatura.

La fusión específica de dos membranas requiere que (1) se reconozcan entre sí; (2) sus superficies estén muy cerca, lo que requiere la eliminación de las moléculas de agua normalmente asociadas con los grupos de cabeza polares de los lípidos; (3) sus estructuras en bicapa se rompan localmente dando lugar a la fusión de la hoja externa de cada membrana (hemifusión), y (4) sus bicapas se fusionen formando una bicapa única continua. La fusión que tiene lugar en la endocitosis mediada por receptor, o secreción regulada, también requiere que (5) el proceso de fusión se desencadene en el momento apropiado o como respuesta a una señal específica. Las proteínas integrales llamadas **proteínas de fusión** favorecen estos procesos, promoviendo un reconocimiento específico y una distorsión local transitoria de la estructura de la bicapa que favorece la fusión de la membrana. (Observe que estas proteínas de fusión no están relacionadas con el producto codificado por dos genes fusio-

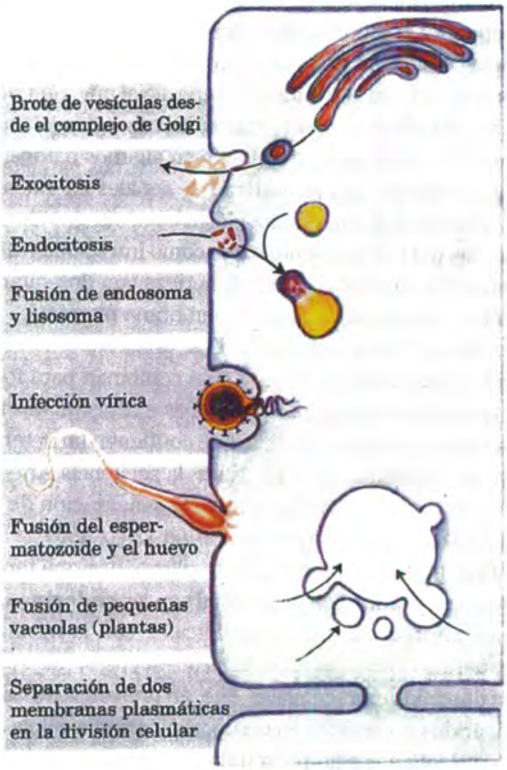


FIGURA 11–22 Fusión de membranas. La fusión de dos membranas es fundamental en multitud de procesos celulares en los que intervienen tanto orgánulos como la membrana plasmática.

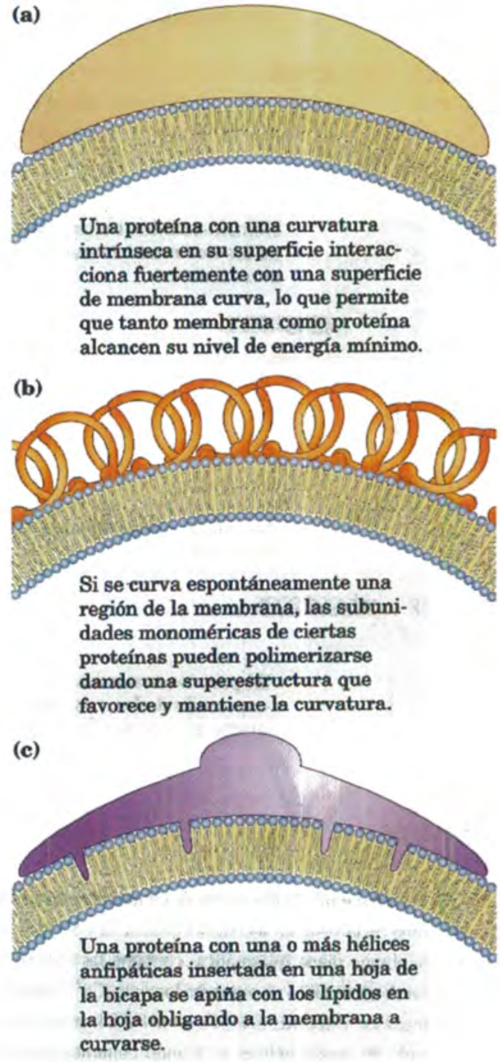


FIGURA 11–23 Tres modelos para la curvatura de las membranas inducida por proteínas.

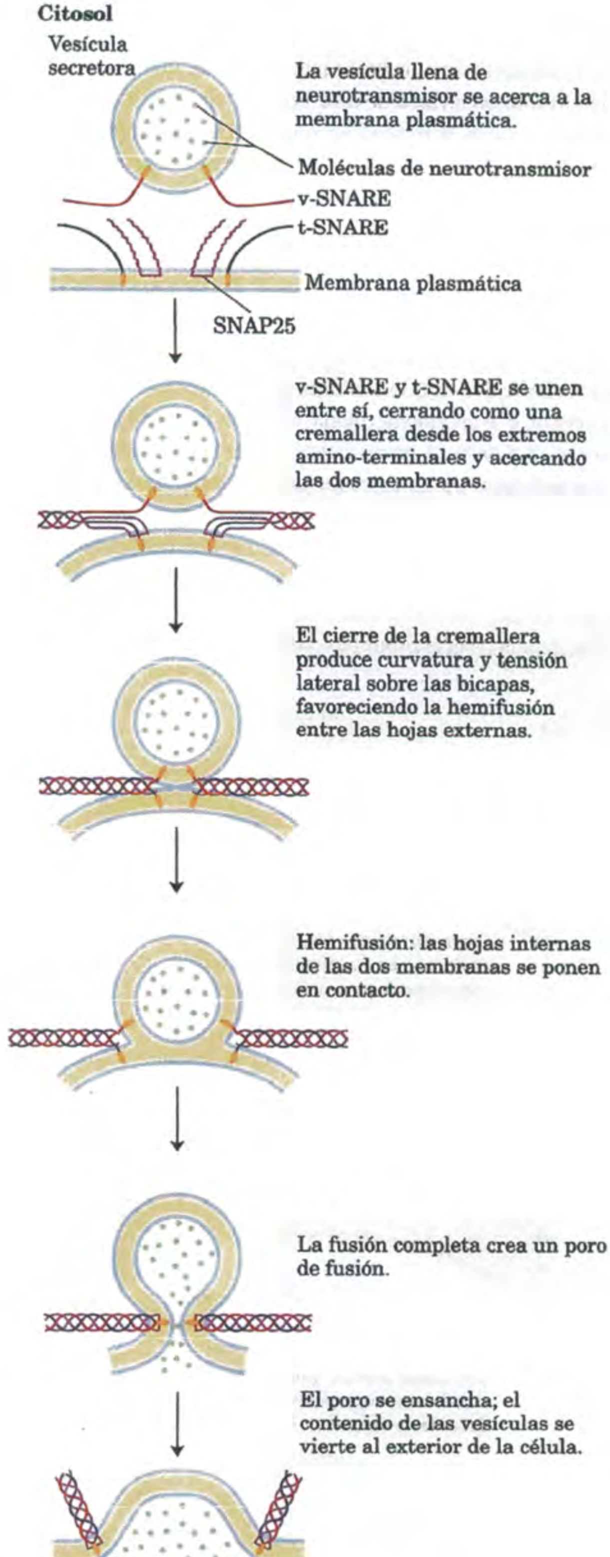


FIGURA 11–24 Fusión durante la liberación de un neurotransmisor en una sinapsis. La membrana de la vesícula secretora contiene la v-SNARE sinaptobrevina (rojo). La membrana diana (plasmática) contiene las t-SNARE sintaxina (azul) y SNAP25 (violeta). Cuando un aumento local de [Ca^{2+}] señala la liberación del neurotransmisor, v-SNARE, SNAP25 y t-SNARE interaccionan formando un haz enrollado de cuatro hélices α, tirando conjuntamente de las dos membranas y rompiendo localmente la bicapa lo que lleva primero a la hemifusión, unión de las hojas internas de las dos membranas, para completar después la fusión de la membrana y la liberación de neurotransmisor.

nados, también llamados proteínas de fusión, descritas en el Capítulo 9).

Un ejemplo bien estudiado de fusión de membrana es el que tiene lugar en las sinapsis cuando vesículas intracelulares cargadas con neurotransmisor se fusionan con la membrana plasmática. Este proceso requiere una familia de proteínas llamadas SNARE **(Fig. 11–24).** Las proteínas SNARE en la cara citoplasmática de las vesículas intracelulares se denominan **v-SNARE;** las que están en las membranas diana con las que se fusionan las vesículas (la membrana plasmática durante la exocitosis) se llaman **t-SNARE.** También intervienen otras dos proteínas, SNAP25 y NSF. Durante la fusión las v- y las t-SNARE se unen entre sí y experimentan un cambio estructural que produce un haz de varillas largas y delgadas formadas por hélices de las v- y las t-SNARE así como dos hélices de SNAP25 (Fig. 11–24). Inicialmente las dos SNARE interaccionan por sus extremos y a continuación cierran como una cremallera el haz de hélices. Este cambio estructural pone en contacto las dos membranas y se inicia la fusión de sus bicapas lipídicas.

El complejo de SNARE y SNAP25 es la diana de la potente toxina de *Clostridium botulinum*, una proteasa que corta enlaces específicos de estas proteínas, impidiendo la neurotransmisión y la muerte consiguiente del organismo. Dada su elevadísima especificidad por estas proteínas, se ha utilizado la toxina botulínica purificada como herramienta para analizar el mecanismo de la liberación de neurotransmisores in vivo e in vitro.

Ciertas proteínas integrales de la membrana plasmática favorecen la adhesión superficial, la señalización y otros procesos celulares

Varias familias de proteínas integrales de la membrana plasmática proporcionan puntos específicos de anclaje entre células, o entre una célula y proteínas de la matriz extracelular. Las **integrinas** son proteínas de adhesión superficial que intervienen en la interacción de una célula con la matriz extracelular y con otras células, entre las que se incluyen algunos patógenos. Las integrinas también son portadoras de señales en ambas direcciones a través de la membrana plasmática, integrando información acerca del entorno tanto extra como intracelular. Todas las integrinas son proteínas heterodiméricas con dos subunidades diferentes (α y β) ancladas a la membrana plasmática por una simple hélice transmembrana. Los dominios extracelulares grandes de las subunidades α y β se combinan para formar un sitio específico de unión para proteínas extracelulares tales como el colágeno y la fibronectina, que contienen un determinante común de la unión de las integrinas, la secuencia Arg–Gly–Asp (RGD). Se describen las funciones de señalización de las integrinas con mayor detalle en el Capítulo 12 (p. 455).

Otras proteínas de membrana plasmática que también intervienen en la adhesión superficial son las **caderinas,** que experimentan interacciones homofílicas ("con la misma clase") con caderinas idénticas en células adyacentes. Las **selectinas** tienen dominios extracelulares que, en presencia de Ca^{2+}, unen polisacáridos específicos en la superficie de una célula adyacente. Las selectinas están presentes principalmente en los diversos tipos de células sanguíneas y en las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos (véase la Fig. 7–31). Son una parte esencial del proceso de coagulación de la sangre.

Las proteínas integrales de membrana intervienen en muchos otros procesos celulares. Actúan como transportadores y canales iónicos (como se discutirá en la Sección 11.3) y como receptores de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento (Capítulo 12). Son esenciales en la fosforilación oxidativa y fotofosforilación (Capítulo 19), y en el reconocimiento célula-célula y antígeno-célula del sistema inmunitario (Capítulo 5). Las proteínas integrales también son responsables principales en la fusión de membranas que acompaña la exocitosis, endocitosis y la entrada de un gran número de virus en las células huésped.

RESUMEN 11.2 Dinámica de las membranas

- Los lípidos de una membrana biológica pueden existir en estado líquido ordenado o en estado líquido desordenado; en este último caso, el movimiento térmico de las cadenas acilo hace que el interior de la bicapa sea fluido. La fluidez se ve afectada por la temperatura, la composición de ácidos grasos y el contenido en esteroles.
- La difusión flip-flop de lípidos entre las hojas interna y externa de una membrana es muy lenta excepto cuando está catalizada específicamente por flipasas, flopasas o escramblasas.
- Los lípidos y proteínas pueden difundir lateralmente dentro del plano de la membrana, pero esta motilidad está limitada por interacciones de las proteínas de membrana con estructuras internas del citoesqueleto e interacciones de lípidos con balsas de lípido. Una clase de balsas de lípidos contienen esfingolípidos y colesterol con un subconjunto de proteínas de membrana que están unidas a GPI o a varias porciones acilo graso de cadena larga.
- La caveolina es una proteína integral de membrana que se asocia con la hoja interna de la membrana plasmática obligándola a curvarse hacia dentro para formar caveolas, que intervienen probablemente en el transporte a través de membranas y en la señalización.
- Proteínas específicas producen una curvatura local de la membrana e intervienen en la fusión de dos membranas, la cual acompaña a procesos tales como la endocitosis, la exocitosis y la invasión vírica.
- Las integrinas son proteínas transmembrana de la membrana plasmática que actúan para unir células entre sí y para transportar mensajes entre la matriz extracelular y el citoplasma.

11.3 Transporte de solutos a través de membranas

Todas las células vivas deben adquirir de su alrededor las materias primas para la biosíntesis y para la producción de energía y deben liberar a su entorno los productos de desecho del metabolismo. Unos pocos compuestos apolares pueden disolverse en la bicapa lipídica y cruzar la membrana sin más ayuda, pero en el caso de compuestos polares o iones es esencial una proteína de membrana para el transporte transmembrana. En algunos casos una proteína de membrana simplemente facilita la difusión de un soluto a favor de su gradiente de concentración, pero el transporte también tiene lugar contra un gradiente de concentración, carga eléctrica o ambos, en cuyo caso el proceso requiere energía **(Fig. 11–25)**. La energía puede venir directamente de la hidrólisis del ATP o puede suministrarse en forma de movimiento de un soluto a favor de su gradiente electroquímico con liberación de suficiente energía para poder transportar otro soluto contra gradiente. Los iones también pueden ser transportados a través de las membranas vía canales iónicos formados por proteínas o pueden ser transportados por ionóforos que son moléculas pequeñas que enmascaran la carga de los iones y permiten que difundan a través de la bicapa lipídica. Con unas pocas excepciones, en el tráfico de moléculas pequeñas a través de la membrana plasmática intervienen proteínas tales como los canales transmembrana, transportadores y bombas. Dentro de la célula eucariótica, los diferentes compartimientos tie-

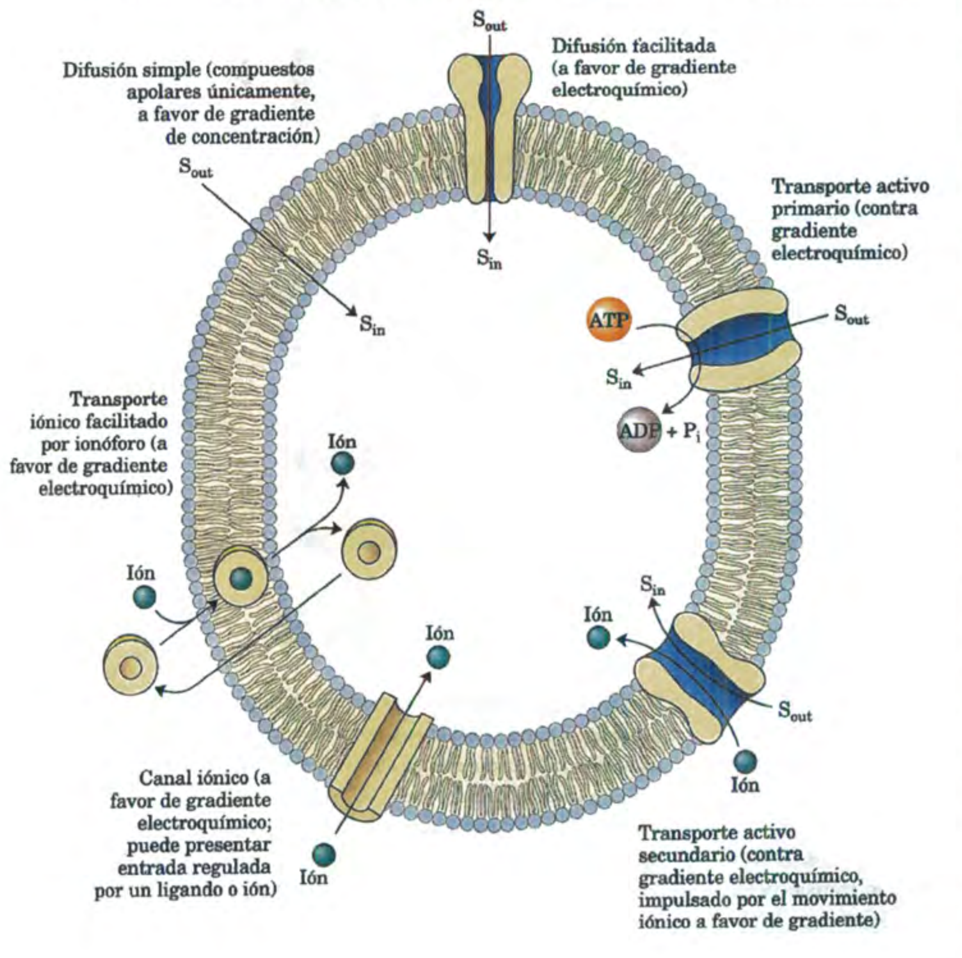


FIGURA 11–25 Resumen de los tipos de transporte.

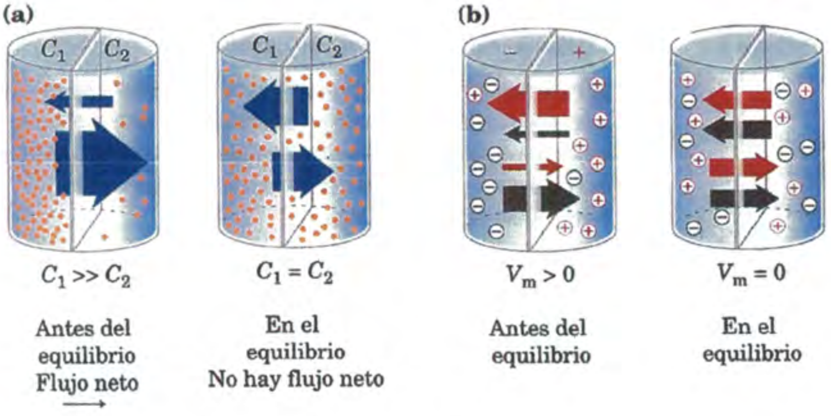


FIGURA 11–26 Desplazamiento de solutos a través de una membrana permeable. (a) El movimiento neto de solutos eléctricamente neutros es hacia el lado de menor concentración de soluto hasta que se alcanza el equilibrio. Las concentraciones de soluto a la izquierda y a la derecha de la membrana se designan C_1 y C_2. La velocidad de movimiento transmembrana (indicado por las flechas grandes) es proporcional al gradiente de concentración, C_2/C_1. (b) El movimiento neto de solutos cargados eléctricamente viene dictado por una combinación del potencial eléctrico (V_m) y la diferencia de concentraciones químicas (C_2/C_1), a través de la membrana; el movimiento neto de iones continúa hasta que su potencial electroquímico llega a cero.

nen diferentes concentraciones de iones e intermedios metabólicos y productos; éstos, también, deben transportarse a través de las membranas intracelulares en procesos en los que intervienen proteínas y que están sujetos a una fuerte regulación.

Proteínas de membrana facilitan el transporte pasivo

Cuando dos compartimientos acuosos que contienen diferentes concentraciones de un componente soluble o un ión están separados por una división permeable (membrana), el soluto se desplaza por **difusión simple** desde la región con una concentración más elevada, a través de la membrana, a la región de concentración más baja, hasta que los dos compartimientos tienen concentraciones iguales de soluto **(Fig. 11–26a)**. Cuando iones de cargas opuestas están separados por una membrana permeable, se crea un gradiente eléctrico transmembrana, un **potencial de membrana, V_m** (expresado en milivoltios). Este potencial de membrana produce una fuerza que se opone al movimiento de los iones que aumentan V_m y que impulsa el movimiento de los iones que reducen V_m (Fig. 11–26b). Así, la dirección en la que un soluto cargado tiende a desplazarse espontáneamente a través de una membrana depende tanto del gradiente químico (la diferencia en concentración de soluto) como del gradiente eléctrico (V_m) a través de la membrana. Juntos, estos dos factores se conocen como **gradiente electroquímico** o **potencial electroquímico.** Este comportamiento de los solutos está de acuerdo con la segunda ley de la termodinámica: las moléculas tienden a adoptar espontáneamente la distribución de máxima aleatoriedad y mínima energía.

Para traspasar una bicapa lipídica, un soluto polar o cargado debe primero eliminar sus interacciones con las moléculas de agua en su capa de hidratación y a continuación difundir alrededor de unos 3 nm (30 Å) a través de una sustancia (lípido) en el que es poco soluble **(Fig. 11–27)**. La energía utilizada para romper la capa de hidratación y desplazar el compuesto polar desde el agua al lípido y a continuación a través de la bicapa lipídica, se recupera cuando el compuesto abandona la membrana del otro lado y se rehidrata. Sin embargo, el estado intermedio del paso transmembrana es un estado de alta energía comparable al estado de transición de una reacción química catalizada por un enzima. En ambos casos se debe superar una barrera de activación para alcanzar el estado intermedio (Fig. 11–27; compárese con la Fig. 6–3). La energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$) para la translocación de un soluto polar a través de la bicapa es tan grande que las bicapas lipídicas puras son virtualmente impermeables a las especies polares o cargadas durante períodos de tiempo significativos para el crecimiento y división celulares.

Las proteínas de membrana disminuyen la energía de activación para el transporte de compuestos polares e iones proporcionando una ruta alternativa a través de la bicapa para solutos específicos. Las proteínas que llevan a cabo esta **difusión facilitada** o **transporte pasivo** no son enzimas en el sentido habitual; sus "sustratos" se desplazan de un compartimiento a otro, pero no son alterados químicamente. Las proteí-

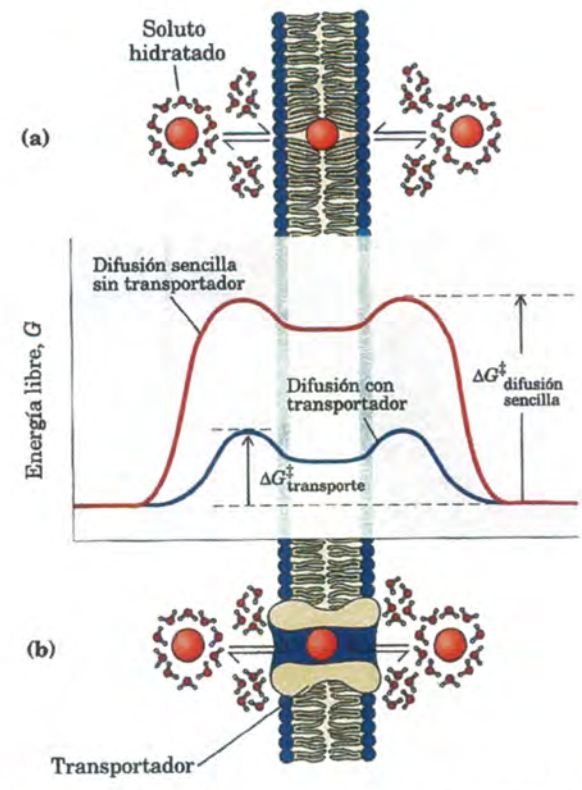


FIGURA 11–27 Cambios energéticos que acompañan el paso de un soluto hidrofílico a través de la bicapa lipídica de una membrana biológica. (a) En la difusión sencilla, la eliminación de la capa de hidratación es altamente endergónica, y la energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$) para la difusión a través de la bicapa es muy alta. (b) Una proteína transportadora reduce la $\Delta G^{\ddagger}$ para la difusión transmembrana del soluto. Lo hace estableciendo interacciones no covalentes con el soluto deshidratado para reemplazar los puentes de hidrógeno con el agua y proporcionando una vía de paso hidrofílica transmembrana.

nas de membrana que aceleran el movimiento de un soluto a través de una membrana facilitando la difusión se conocen como **transportadores** o **permeasas.**

Al igual que los enzimas, los transportadores unen sus sustratos con especificidad estereoquímica a través de múltiples interacciones débiles, no covalentes. La variación de energía libre negativa asociada con estas interacciones débiles, $\Delta G_{\text{unión}}$ contrarresta la variación de energía libre positiva que acompaña la pérdida de agua de hidratación del sustrato, $\Delta G_{\text{deshidratación}}$, dando lugar a una disminución de la $\Delta G^{\ddagger}$ del paso transmembrana (Fig. 11–27). Los transportadores abarcan la bicapa lipídica varias veces formando un canal transmembrana recubierto con cadenas laterales de aminoácidos hidrofílicos. El canal proporciona una ruta alternativa para que un sustrato específico se traslade a través de la bicapa lipídica sin tener que disolverse en la bicapa, lo que disminuye aun más la $\Delta G^{\ddagger}$ para la difusión transmembrana. El resultado es un incremento de muchos órdenes de magnitud de la velocidad de paso transmembrana del sustrato.

Los transportadores pueden agruparse en superfamilias según sus estructuras

Sabemos, a partir de estudios genómicos, que los transportadores constituyen una parte significativa del total de proteínas codificadas en los genomas tanto de organismos sencillos como complejos. Existen probablemente un millar o más de transportadores diferentes en el genoma humano. Existen dos amplias categorías de transportadores: portadores (transportadores) y canales **(Fig. 11–28)**. Los **portadores** (transportadores) unen sus sustratos con estereoespecificidad elevada, catalizan el transporte a velocidades que están muy por debajo de los límites de la difusión libre y son saturables en el mismo sentido que lo son los enzimas: hay una concentración de sustrato por encima de la cual un aumento no se traduce en una mayor velocidad de transporte. Los **canales** permiten, por lo general, el desplazamiento transmembrana a velocidades que son varios órdenes de magnitud superiores a las típicas de los transportadores, velocidades que se aproximan al límite de la difusión no entorpecida. Los canales muestran típicamente menos estereoespecificidad que los transportadores y habitualmente no son saturables. La mayoría de canales son complejos oligoméricos de varias subunidades, a menudo idénticas, mientras que muchos transportadores funcionan como proteínas monoméricas. La clasificación como transportador o canal es la principal distinción dentro del grupo. Dentro de cada una de estas categorías existen superfamilias de diversos tipos que se definen no sólo por sus secuencias primarias sino por su estructura secundaria. Algunos canales están constituidos principalmente por segmentos helicoidales transmembrana mientras que otros tienen estructuras en barril β. Entre los transportadores, algunos simplemente facilitan la difusión a favor de un gradiente de concentración; son la superfamilia de los **transportadores pasivos.** Los **transportadores activos** pueden impulsar sustratos a través de la membrana contra un gradiente de concentración; algunos utilizan energía proporcionada directamente por una reacción química (transportadores activos primarios), mientras que otros acoplan el transporte contra gradiente de un sustrato con el transporte a favor de gradiente del otro (transportadores activos secundarios). A continuación describiremos algunos representantes bien estudiados de las principales superfamilias de transportadores. Volverá a encontrar algunos de estos transportadores en capítulos posteriores en el contexto de las rutas metabólicas en las que participan.

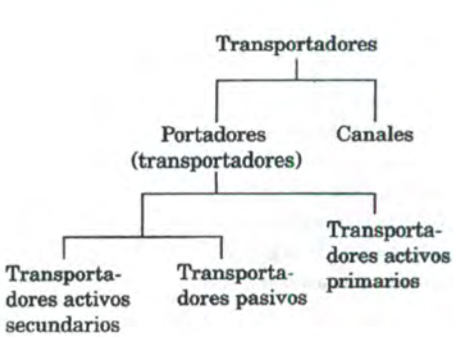


FIGURA 11–28 Clasificación de los transportadores.

El transportador de glucosa de los eritrocitos facilita el transporte pasivo

El metabolismo productor de energía del eritrocito depende de un suministro constante de glucosa que proviene del plasma sanguíneo, donde la concentración de glucosa se mantiene alrededor de 5 mM. La glucosa penetra en el eritrocito por difusión facilitada vía un transportador de glucosa específico, a una velocidad unas 50.000 veces mayor que la difusión transmembrana no catalizada. El transportador de glucosa de los eritrocitos (llamado GLUT1 para distinguirlo de transportadores de glucosa relacionados de otros tejidos) es una proteína integral tipo III (M_r ~45.000) que tiene 12 segmentos hidrofóbicos, cada uno de los cuales se cree que forma una hélice que abarca la membrana. La estructura detallada de GLUT1 no se conoce todavía, pero un modelo plausible sugiere que la unión lado por lado de varias hélices adyacentes produce un canal transmembrana revestido de residuos hidrofílicos que pueden formar un enlace por puente de hidrógeno con la glucosa al desplazarse por el canal **(Fig. 11–29)**.

El proceso de transporte de glucosa se puede describir por analogía con una reacción enzimática en la que el "sustrato" es la glucosa del exterior de la célula (S_{out}), el "producto" es la glucosa del interior (S_{in}) y el "enzima" es el transportador, T. Cuando se mide la velocidad inicial de captación de glucosa en función de la concentración externa de glucosa **(Fig. 11–30)**, la gráfica resultante es hiperbólica; a concentraciones externas de glucosa elevadas la velocidad de captación se acerca a V_{max}. Formalmente, un proceso de transporte de este tipo se puede describir según las ecuaciones

$$
\begin{array}{ccc}
S_{out} + T_1 & \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} & S_{out} \bullet T_1 \\
k_{-4}\Big\Uparrow\Big\Downarrow k_4 & & k_{-2}\Big\Uparrow\Big\Downarrow k_2 \\
S_{in} + T_2 & \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} & S_{in} \bullet T_2
\end{array}
$$

en donde k_1, k_{-1}, y así sucesivamente, son las constantes de velocidad directa e inversa para cada paso; T_1 es la conformación del transportador en la que el sitio de unión de la glucosa apunta hacia el exterior, y T_2 la conformación en la que apunta hacia

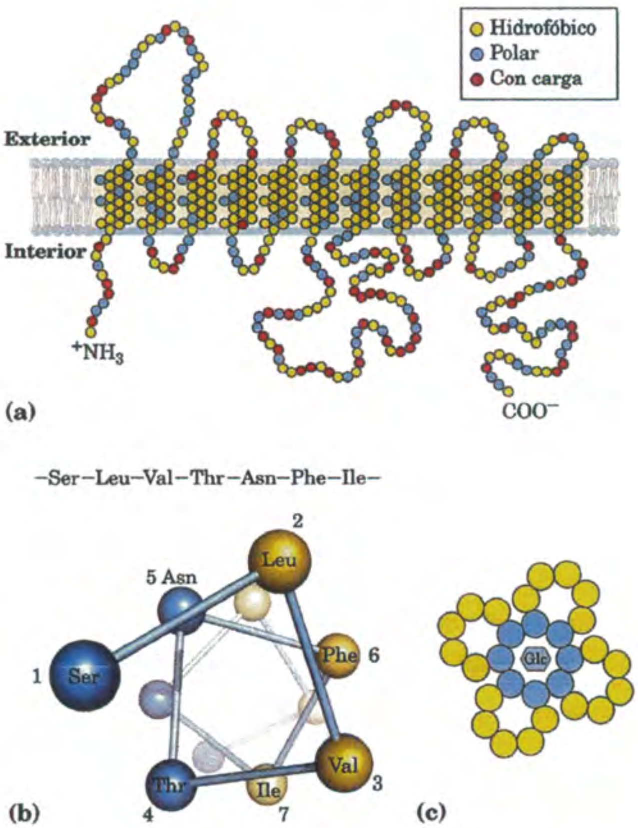


FIGURA 11–29 Estructura propuesta para GLUT1. **(a)** Las hélices transmembrana están representadas como filas oblicuas (en ángulo) de tres o cuatro residuos aminoácidos, representando cada fila una vuelta de la hélice α. Nueve de las 12 hélices contienen tres o más residuos aminoácidos polares o con carga (azul o rojo), a menudo separados por varios residuos hidrofóbicos (amarillo). Esta representación de la topología no pretende representar la estructura tridimensional. **(b)** Un diagrama de rueda helicoidal muestra la distribución de residuos polares y apolares en la superficie de un segmento helicoidal. La hélice está esquematizada como si se observase a lo largo de su eje desde el extremo amino-terminal. Los residuos adyacentes en la secuencia lineal están conectados, y cada residuo está puesto alrededor de la rueda en la posición que ocupa en la hélice; recuerde que se requieren 3,6 residuos para una vuelta completa de la hélice α. En este ejemplo, los residuos polares (azul) están en una cara de la hélice y los residuos hidrofóbicos (amarillo) en la otra. Esto es, por definición, una hélice anfipática. **(c)** La asociación lateral de cuatro hélices anfipáticas, cada una con su cara polar orientada hacia la cavidad central, puede producir un canal transmembrana revestido con residuos polares (y con carga). Este canal proporciona muchas oportunidades para la formación de puentes de hidrógeno con la glucosa que se desplaza a través del transportador.

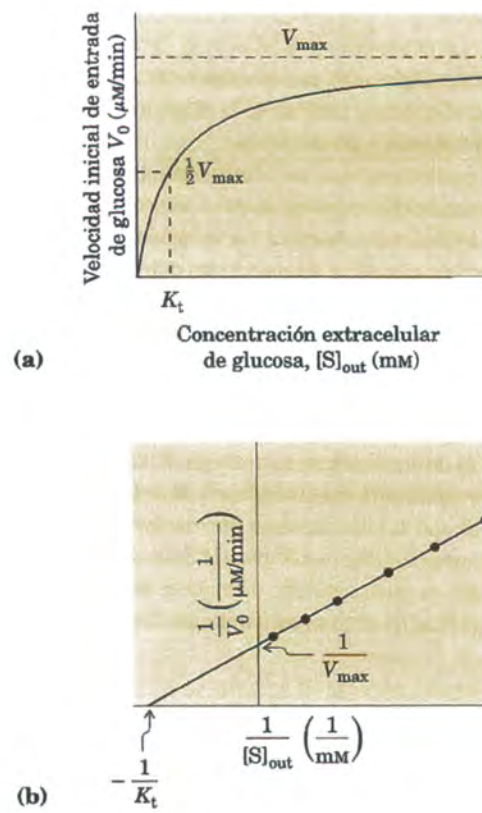


FIGURA 11–30 Cinética del transporte de glucosa a los eritrocitos. **(a)** La velocidad inicial de entrada de glucosa a un eritrocito, V_0, depende de la concentración inicial de glucosa en el exterior, $[S]_{out}$. **(b)** Gráfica doble-recíproca de los datos en **(a)**. La cinética de la difusión facilitada es análoga a la cinética de una reacción catalizada por un enzima. Compare estas gráficas con la Figura 6–11, y con la Figura 1 en el Recuadro 6–1. Obsérvese que K_t es análoga a K_m, la constante de Michaelis.

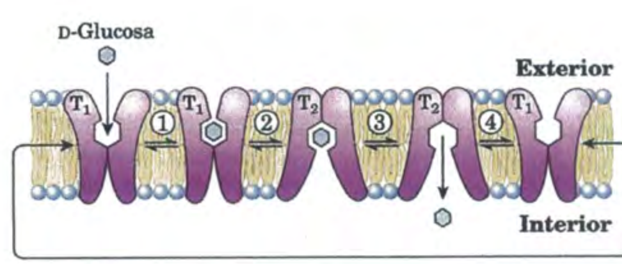


FIGURA 11–31 Modelo del transporte de glucosa a los eritrocitos por GLUT1. El transportador existe en dos conformaciones: T_1, con el sitio de unión a glucosa expuesto en la superficie externa de la membrana plasmática, y T_2, con el sitio de unión expuesto en la superficie interna. El transporte de glucosa tiene lugar en cuatro etapas. ① La glucosa del plasma sanguíneo se une a un sitio estereoespecífico en T_1, rebajando así la energía de activación para un cambio de conformación ② desde glucosa$_{out}\cdot T_1$ a glucosa$_{in}\cdot T_2$, efectuando el paso transmembrana de la glucosa. ③ La glucosa es liberada desde T_2 al citoplasma, y ④ el transportador vuelve a la conformación T_1, listo para transportar otra molécula de glucosa.

el interior. Las etapas están resumidas en la **Figura 11–31**. Dado que cada paso en la secuencia es reversible, el transportador es, en principio, capaz de transportar la glucosa igualmente hacia el interior o el exterior de la célula. No obstante, la glucosa siempre se desplaza a favor del gradiente de concentración, lo que normalmente quiere decir hacia *dentro* de la célula. La glucosa que entra en una célula generalmente se metaboliza de manera inmediata, por lo que la concentración intracelular de glucosa es baja en comparación con la de la sangre.

Las ecuaciones de velocidad del transporte de glucosa se pueden deducir exactamente igual que para las reacciones cata-

TABLA 11–3 Transportadores de glucosa en el genoma humano

Transportador	Tejido(s) donde se expresa	Gen	Función*
GLUT1	Ubicuo	*SLC2A1*	Captación basal de glucosa
GLUT2	Hígado, islotes pancreáticos, intestino	*SLC2A2*	En el hígado, eliminación de exceso de glucosa de la sangre; en el páncreas regulación de la liberación de insulina
GLUT3	Cerebro (neuronal)	*SLC2A3*	Captación basal de glucosa
GLUT4	Músculo, grasa, corazón	*SLC2A4*	Actividad incrementada por la insulina
GLUT5	Intestino, testículos, riñón, esperma	*SLC2A5*	Principalmente transporte de fructosa
GLUT6	Bazo, leucocitos, cerebro	*SLC2A6*	Posiblemente sin función transportadora
GLUT7	Microsomas hepáticos	*SLC2A7*	—
GLUT8	Testículos, blastocisto, cerebro	*SLC2A8*	—
GLUT9	Hígado, riñón	*SLC2A9*	—
GLUT10	Hígado, páncreas	*SLC2A10*	—
GLUT11	Corazón, músculo esquelético	*SLC2A11*	—
GLUT12	Músculo esquelético, adiposo, intestino delgado	*SLC2A12*	—

*Un guión indica función incierta.

lizadas por enzimas (Capítulo 6), dando una expresión análoga a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]_{out}}{K_t + [S]_{out}} \qquad (11\text{–}1)$$

en la que V_0 es la velocidad inicial de acumulación de glucosa en el interior de la célula cuando su concentración en el medio circundante es $[S]_{out}$, y la K_t ($K_{transporte}$) es una constante análoga a la constante de Michaelis, es decir, una combinación de constantes de velocidad característica de cada sistema de transporte. Esta ecuación describe la velocidad *inicial* (la velocidad observada cuando $[S]_{in} = 0$). Como en el caso de las reacciones catalizadas por enzimas, la forma intersección-pendiente de la ecuación describe una gráfica lineal de $1/V_0$ frente $1/[S]_{out}$ a partir de la cual podemos obtener los valores de K_t y V_{max} (Fig. 11–30b). Cuando $[S]_{out} = K_t$, la velocidad de captación es $\frac{1}{2}V_{max}$; el proceso de transporte está semisaturado. La concentración de glucosa en la sangre, de 4,5 a 5 mM, es unas tres veces superior al valor de K_t lo que asegura que GLUT1 está casi saturado con sustrato y opera cerca de la V_{max}.

Dado que en la conversión de S_{out} a S_{in} no se rompen ni se forman enlaces químicos, ni el "sustrato" ni el "producto" son intrínsecamente más estables y el proceso de entrada es totalmente reversible. Cuando $[S]_{in}$ se acerca a $[S]_{out}$, las velocidades de entrada y salida se igualan. Dicho sistema es, por tanto, incapaz de acumular glucosa dentro de las células a concentraciones superiores a las del medio circundante; simplemente consigue un equilibrio de la glucosa a ambos lados de la membrana a una velocidad mucho mayor de la que tendría lugar en ausencia de un transportador específico. GLUT1 es específico de la D-glucosa, para la que la K_t es 1,5 mM. Para los análogos próximos D-manosa y D-galactosa, que sólo difieren en la posición de un grupo hidroxilo, los valores de K_t son 20 y 30 mM, respectivamente, y para la L-glucosa, K_t es superior a 3.000 mM. De este modo, GLUT1 muestra los tres rasgos del transporte pasivo: velocidades de difusión elevadas a favor de un gradiente de concentración, saturabilidad y especificidad.

En el genoma humano se encuentran codificados doce transportadores de glucosa, cada uno con propiedades cinéticas, patrones de distribución tisular y función diferentes (Tabla 11–3). En el hígado, GLUT2 transporta glucosa fuera de los hepatocitos cuando se degrada el glucógeno del hígado para reponer la glucosa sanguínea. GLUT2 tiene una K_t de aproximadamente 66 mM, de manera que puede responder a niveles elevados de glucosa intracelular (debido a la degradación del glucógeno) incrementando el transporte hacia el exterior. Los músculos esquelético y cardíaco, así como el tejido adiposo, tienen otro transportador de glucosa, GLUT4 (K_t = 5 mM), que se distingue por su estimulación por insulina: su actividad aumenta cuando la insulina señala que existe una elevada concentración de glucosa en sangre, con lo que se incrementa de este modo la velocidad de captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo (el Recuadro 11–2 describe algunos funcionamientos defectuosos de este transportador).

El intercambiador de cloruro-bicarbonato cataliza el cotransporte electroneutro de aniones a través de la membrana plasmática

El eritrocito contiene otro sistema de difusión facilitada, un intercambiador de aniones, que es esencial en el transporte de CO_2 desde tejidos tales como el músculo y el hígado a los pulmones. El CO_2 de desecho procedente de los tejidos en respiración y liberado al plasma sanguíneo entra en el eritrocito, donde se convierte en bicarbonato (HCO_3^-) por el enzima carbónico anhidrasa. (Recuerde que el HCO_3^- es el principal tampón del pH sanguíneo; véase la Fig. 2–20). El HCO_3^- vuelve a entrar en el plasma sanguíneo para ser transportado a los pulmones **(Fig. 11–32)**. Debido a que el HCO_3^- es mucho más soluble en el plasma sanguíneo que el CO_2, esta ruta indirecta aumenta la

RECUADRO 11-2 MEDICINA Transporte defectuoso de glucosa y de agua en dos formas de diabetes

Cuando la ingestión de una comida rica en glúcidos hace que el nivel de glucosa en la sangre exceda la concentración normal entre comidas (aproximadamente 5 mM), los miocitos del músculo cardíaco y del músculo esquelético captan el exceso de glucosa (que se almacena en forma de glucógeno) así como los adipocitos (que la convierten en triacilgliceroles). El transportador de glucosa GLUT4 interviene en la captación de glucosa por los miocitos y adipocitos. Entre comidas, la membrana plasmática de estas células contiene algo de GLUT4, pero la mayoría está secuestrado en las membranas de pequeñas vesículas intracelulares (Fig. 1). La insulina liberada por el páncreas en respuesta a la alta glucosa sanguínea provoca el desplazamiento de estas vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática, donde se fusionan, exponiendo así las moléculas de GLUT4 en la cara externa de la célula (véase la Fig. 12–16). Con más moléculas de GLUT4 en acción, la velocidad de captación de glucosa aumenta 15 veces o más. Cuando los niveles de glucosa en la sangre vuelven a la normalidad, disminuye la liberación de insulina y la mayoría de las moléculas de GLUT4 se eliminan de la membrana plasmática y se almacenan en vesículas.

En la diabetes mellitus tipo I (aparición juvenil), la incapacidad para liberar insulina (y, por lo tanto, para movilizar los transportadores de glucosa) provoca una baja velocidad de captación de glucosa en músculo y tejido adiposo. Una consecuencia de ello es un período prolongado de altos niveles de glucosa en sangre después de una ingesta rica en glúcidos. Esta condición es la base de la prueba de tolerancia a la glucosa usada para diagnosticar la diabetes (Capítulo 23).

La permeabilidad al agua de las células epiteliales que recubren el conducto colector del riñón es debida a la presencia de una acuaporina (AQP-2) en sus membranas plasmáticas apicales (en la cara de la luz del conducto). La vasopresina (hormona antidiurética, ADH) regula la retención del agua movilizando moléculas de AQP-2 almacenadas en las membranas de vesículas dentro de las células epiteliales, de forma muy parecida a como la insulina moviliza el GLUT4 en el músculo y el tejido adiposo. Cuando las vesículas se fusionan con la membrana plasmática de la célula epitelial, la permeabilidad al agua aumenta drásticamente y se reabsorbe más agua en el conducto colector que se retorna a la sangre. Cuando los niveles de vasopresina disminuyen, se resecuestra AQP-2 dentro de las vesículas, reduciendo la retención de agua. En la enfermedad humana relativamente poco común diabetes insípida, un defecto genético en AQP-2 provoca una reabsorción defectuosa de agua por el riñón. El resultado es la excreción de grandes volúmenes de orina muy diluida.

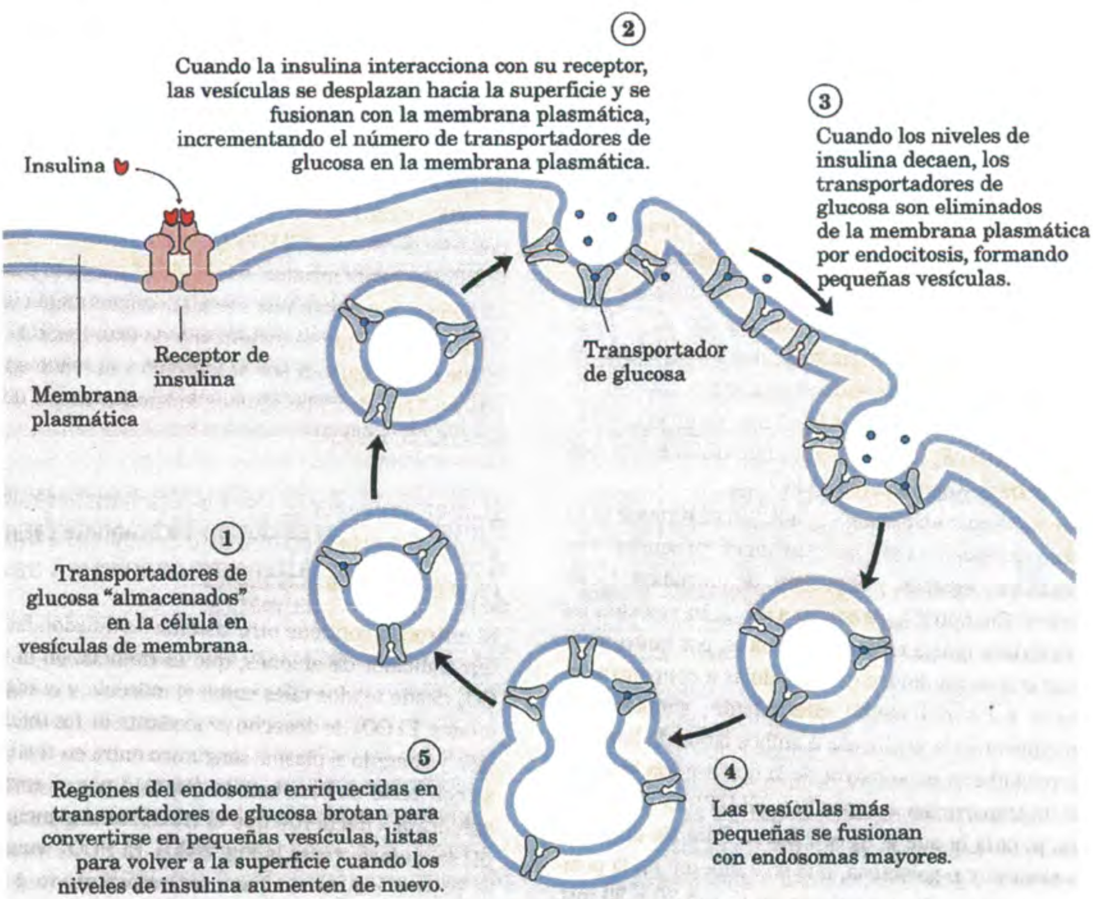


FIGURA 1 Regulación por insulina del transporte de glucosa por GLUT4 al interior de un miocito.

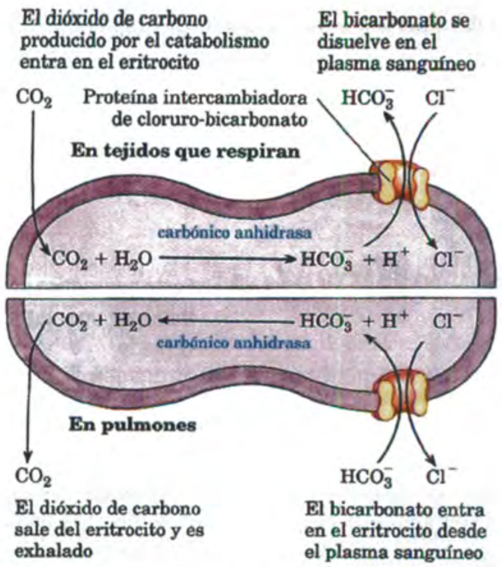


FIGURA 11–32 Intercambiador de cloruro-bicarbonato de la membrana de eritrocito. Este sistema cotransportador permite la entrada y salida de HCO_3^- sin cambios en el potencial eléctrico transmembrana. Su papel es incrementar la capacidad transportadora de CO_2 de la sangre.

capacidad de la sangre para transportar dióxido de carbono desde los tejidos a los pulmones. En los pulmones, el HCO_3^- vuelve a entrar en el eritrocito y se convierte en CO_2, que es finalmente liberado en el espacio pulmonar y exhalado. Para que esta lanzadera sea efectiva se requiere un movimiento muy rápido del HCO_3^- a través de la membrana del eritrocito.

El **intercambiador de cloruro-bicarbonato,** también llamado **proteína intercambiadora de aniones (AE),** aumenta la velocidad de transporte del HCO_3^- a través de la membrana del eritrocito en un factor de más de un millón. Al igual que el transportador de glucosa, es una proteína integral que probablemente abarca la membrana al menos 12 veces. Esta proteína facilita el movimiento simultáneo de dos aniones: por cada ión HCO_3^- que se traslada en una dirección, se traslada un ión Cl^- en la dirección opuesta **(Fig. 11–33)** sin transferencia neta de carga; el intercambio es **electroneutro.** El acoplamiento del movimiento de Cl^- y HCO_3^- es obligado; en ausencia de cloruro, se para el transporte de bicarbonato. En este aspecto, el intercambiador aniónico es típico de los **sistemas de cotransporte,** que trasladan simultáneamente dos solutos a través de la membrana. Cuando, como en este caso, los dos sustratos se mueven en direcciones opuestas, el proceso es **antiparalelo (antiport).** En el **cotransporte paralelo (simport),** los dos sustratos se trasladan simultáneamente en la misma dirección. Los transportadores que sólo llevan un sustrato, tal como el de la glucosa del eritrocito, son sistemas de **transporte simple (uniport)** (Fig. 11–33). El genoma humano contiene genes para tres intercambiadores cloruro-bicarbonato muy relacionados, todos con la misma topología transmembrana. Los eritrocitos tienen el transportador AE1, el AE2 predomina en el hígado y el AE3 está presente en las membranas plasmáticas del cerebro, corazón y retina. También hay intercambiadores de aniones similares en plantas y microorganismos.

El transporte activo da lugar al movimiento de soluto contra un gradiente de concentración o un gradiente electroquímico

En el transporte pasivo, la especie transportada siempre se mueve a favor del gradiente electroquímico y no se produce nunca una acumulación por encima de la concentración de equilibrio. Por el contrario, el transporte activo da lugar a la acumulación de un soluto por encima del punto de equilibrio. El transporte activo está desfavorecido termodinámicamente (endergónico) y se da solamente cuando está acoplado (directa o indirectamente) a un proceso exergónico tal como la absorción de luz solar, una reacción de oxidación, la rotura del ATP, o el flujo concomitante de otra especie química a favor de su gradiente electroquímico. En el **transporte activo primario,** la acumulación de soluto está acoplada directamente a una reacción química exergónica tal como la conversión de ATP en ADP + P_i **(Fig. 11–34).** El **transporte activo secundario** tie-

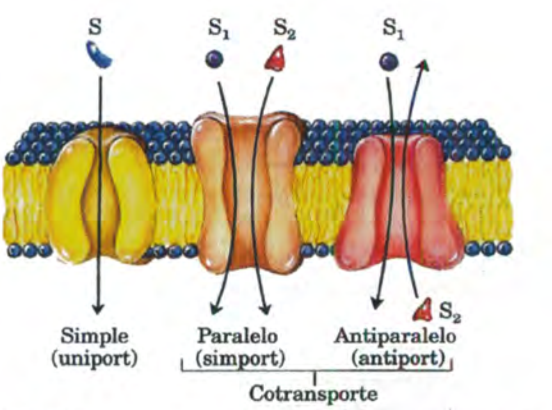


FIGURA 11–33 Tres clases generales de sistemas transportadores. Los transportadores difieren en el número de solutos (sustratos) transportados y en la dirección en la que cada uno es transportado. En el texto se discuten ejemplos de los tres tipos de transportadores. Observe que esta clasificación no nos dice nada sobre si son procesos que requieren energía (transporte activo) o procesos independientes de energía (transporte pasivo).

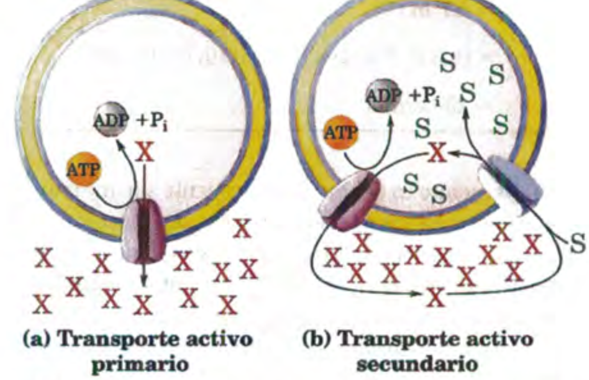


FIGURA 11–34 Dos tipos de transporte activo. (a) En el transporte activo primario, la energía liberada por la hidrólisis de ATP impulsa el movimiento del soluto en contra de un gradiente electroquímico. **(b)** En el transporte activo secundario se ha establecido un gradiente de un ión X (a menudo Na^+) por un transporte activo primario. El movimiento de X a favor de su gradiente electroquímico proporciona entonces la energía para impulsar el cotransporte de un segundo soluto (S) contra su gradiente electroquímico.

ne lugar cuando el transporte endergónico (cuesta arriba) de un soluto está acoplado al flujo exergónico (cuesta abajo) de un soluto diferente que fue bombeado originariamente cuesta arriba mediante un transporte activo primario.

La cantidad de energía necesaria para el transporte de un soluto contra un gradiente puede calcularse a partir del gradiente de concentración inicial. La ecuación general para la variación de energía libre en el proceso químico que transforma S en P es

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln ([\mathrm{P}]/[\mathrm{S}]) \qquad (11\text{–}2)$$

en donde $\Delta G'^{\circ}$ es la variación de energía libre estándar, R es la constante de los gases, 8,315 J/mol · K, y T es la temperatura absoluta. Cuando la "reacción" es simplemente el transporte de un soluto desde una región en donde su concentración es C_1 a otra región en la que su concentración es C_2, no se forman ni rompen enlaces por lo que la variación de energía libre estándar, $\Delta G'^{\circ}$, es cero. La variación de energía libre para el transporte, ΔG_t, es

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) \qquad (11\text{–}3)$$

Si hay una diferencia de diez veces en la concentración entre los dos compartimientos, el coste de trasladar 1 mol de un soluto no cargado a 25 °C cuesta arriba a través de una membrana que separa los compartimientos es, por consiguiente

$$\Delta G = (8{,}315 \text{ J/mol·K})(298 \text{ K}) \ln (10/1) = 5.700 \text{ J/mol}$$
$$= 5{,}7 \text{ kJ/mol}$$

La ecuación 11-3 es válida para todos los solutos sin carga.

EJEMPLO PRÁCTICO 11–1 Coste energético de bombear un soluto sin carga

Calcule el coste energético (variación de energía libre) de bombear un soluto no cargado contra un gradiente de concentración de $1{,}0 \times 10^4$ veces, a 25 °C.

Solución: Empiece con la Ecuación 11–3. Sustituya (C_2/C_1) por $1{,}0 \times 10^4$, R por 8,315 J/mol · K y T por 298:

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1)$$
$$= (8{,}315 \text{ J/mol·K})(298 \text{ K}) \ln (1{,}0 \times 10^4)$$
$$= 23 \text{ kJ/mol}$$

Cuando el soluto es un *ión*, su movimiento sin un contraión correspondiente da lugar a la separación endergónica de cargas positivas y negativas formando un potencial eléctrico; un proceso de transporte de este tipo se dice que es **electrogénico.** El coste energético de mover un ión depende del potencial electroquímico (p. 390), la suma de los gradientes químico y eléctrico:

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F}\,\Delta\psi \qquad (11\text{–}4)$$

donde Z es la carga del ión, $\mathcal{F}$ es la constante de Faraday (96.480 J/V · mol) y $\Delta\psi$ es el potencial eléctrico transmembrana (en voltios). Las células eucarióticas tienen, típicamente, potenciales eléctricos a través de sus membranas plasmáticas del orden de 0,05 a 0,1 V (con el interior negativo respecto al exterior), por lo que el segundo término de la Ecuación 11–4 puede contribuir significativamente a la variación total de energía libre para el transporte de un ión. La mayoría de células mantienen diferencias de más de diez veces en la concentración de iones a través de sus membranas plasmáticas o intracelulares, por lo que en muchas células y tejidos el transporte activo constituye un proceso principal de consumo de energía.

EJEMPLO PRÁCTICO 11–2 Coste energético de bombear un soluto cargado

Calcule el coste energético (variación de energía libre) de bombear Ca^{2+} desde el citosol, en donde su concentración es alrededor de $1{,}0 \times 10^{-7}$ M, al fluido extracelular en donde su concentración es alrededor de 1,0 mM. Suponga una temperatura de 37 °C (temperatura corporal de un mamífero) y un potencial transmembrana estándar de 50 mV (negativo en el interior) para la membrana plasmática.

Solución: En este cálculo, han de tenerse en cuenta tanto el gradiente de concentración como el potencial eléctrico. En la Ecuación 11–4 sustituya R por 8,315 J/mol · K, T por 310 K, C_2 por $1{,}0 \times 10^{-3}$, C_1 por $1{,}0 \times 10^{-7}$, $\mathcal{F}$ por 96.500 J/V · mol, Z por +2 (la carga de un ión Ca^{2+}) y $\Delta\psi$ por 0,050 V. Observe que el potencial transmembrana es 50 mV (negativo el interior) por lo que el cambio en potencial cuando un ión se desplaza desde el interior al exterior es 50 mV.

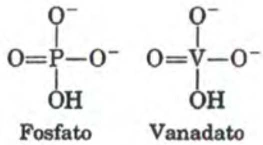
$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F}\,\Delta\psi$$
$$= (8{,}315 \text{ J/mol·K})(310 \text{ K}) \ln \frac{1{,}0 \times 10^{-3}}{1{,}0 \times 10^{-7}}$$
$$+ 2\,(96.500 \text{ J/V·mol})(0{,}050 \text{ V})$$
$$= 33 \text{ kJ/mol}$$

El mecanismo del transporte activo es de importancia fundamental en biología. Tal como veremos en el Capítulo 19, la formación de ATP en las mitocondrias y cloroplastos tiene lugar mediante un mecanismo que es, fundamentalmente, el transporte de iones impulsado por el ATP operando a la inversa. La energía disponible a partir del flujo espontáneo de protones a través de una membrana se puede calcular mediante la Ecuación 11–4; recuerde que para el flujo *a favor* de un gradiente electroquímico, el signo de ΔG es negativo mientras que el valor de ΔG para el transporte de iones *en contra* de un gradiente electroquímico tiene un signo positivo.

Las ATPasas tipo P experimentan fosforilación durante sus ciclos catalíticos

La familia de transportadores activos denominados **ATPasas tipo P** son transportadores de cationes que se fosforilan reversiblemente por acción del ATP (de ahí el nombre tipo P) durante el ciclo de transporte. La fosforilación obliga a un cambio de conformación que es crucial para el transporte del catión a través de la membrana. El genoma humano codifica al menos 70 ATPasas tipo P que comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos y topología, especialmente cerca del residuo Asp que experimenta fosforilación. Todas son proteínas integra-

les en la que pueden predecirse ocho o diez regiones que abarcan la membrana en un polipéptido único (tipo III en la Fig. 11–8) y todas son sensibles a la inhibición por el análogo del fosfato **vanadato.**



Las ATPasas de tipo P están distribuidas muy ampliamente en eucariotas y bacterias. En tejidos animales, la Ca^{2+} ATPasa (transportador simple de Ca^{2+}) y la Na^+K^+ ATPasa (cotransportador antiparalelo de iones Na^+ y K^+) son ATPasas tipo P que mantienen diferencias en la composición iónica del citosol y el medio extracelular. Las células parietales que forran el estómago de los mamíferos tienen una ATPasa tipo P que bombea H^+ y K^+ a través de la membrana plasmática, acidificando de este modo el contenido del estómago. Las flipasas de lípidos, tal como mencionamos anteriormente, están relacionadas tanto estructural como funcionalmente con los transportadores tipo P. En las plantas vasculares, una ATPasa de tipo P bombea protones fuera de la célula, estableciendo una diferencia electroquímica de hasta 2 unidades de pH y 250 mV a través de la membrana plasmática. Una ATPasa de tipo P similar del hongo del pan *Neurospora* bombea protones fuera de las células para establecer un potencial de membrana con el interior negativo, utilizado para impulsar la captación de sustratos e iones del medio circundante mediante transporte activo secundario. Las bacterias utilizan ATPasas de tipo P para bombear al exterior iones de metales pesados tóxicos tales como Cd^{2+} y Cu^{2+}.

Las bombas de tipo P mejor conocidas son las bombas de Ca^{2+} que mantienen una baja concentración de Ca^{2+} en el citosol de prácticamente todas las células. La **bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática** bombea iones calcio fuera de la célula y otra bomba de tipo P del retículo endoplasmático transporta Ca^{2+} dentro de la luz del RE. (En los miocitos, el Ca^{2+} se encuentra secuestrado normalmente en una forma especializada de retículo endoplasmático denominado retículo sarcoplasmático; la liberación de este Ca^{2+} desencadena la contracción muscular.)

Las **bombas de calcio del retículo sarcoplasmático y del retículo endoplasmático (SERCA)** son ATPasas de tipo P que están muy relacionadas en estructura y mecanismo. La bomba SERCA del retículo sarcoplasmático, que comprende el 80% de las proteínas de esta membrana, consiste en un polipéptido sencillo (M_r ~110.000) que atraviesa la membrana diez veces **(Fig. 11–35)**. Tres dominios citotosólicos formados por largos bucles conectan las hélices transmembrana: el dominio N, en donde se unen el *n*ucleótido ATP y Mg^{2+}; el dominio P que contiene el residuo Asp fosforilado (*p*hosphorylated) característico de todas las ATPasas de tipo P; y el dominio A (*a*ctuador), que comunica movimientos de los dominios N y P hacia los dos sitios de unión de Ca^{2+}. El dominio M contiene las hélices trasmembrana y los sitios de fijación de Ca^{2+} que están localizados cerca del medio de la bicapa de la membrana, a unos 40 a 50 Å del residuo Asp fosforilado; de este modo la fosforilación-desfosforilación de Asp no afecta directamente la fijación de Ca^{2+}.

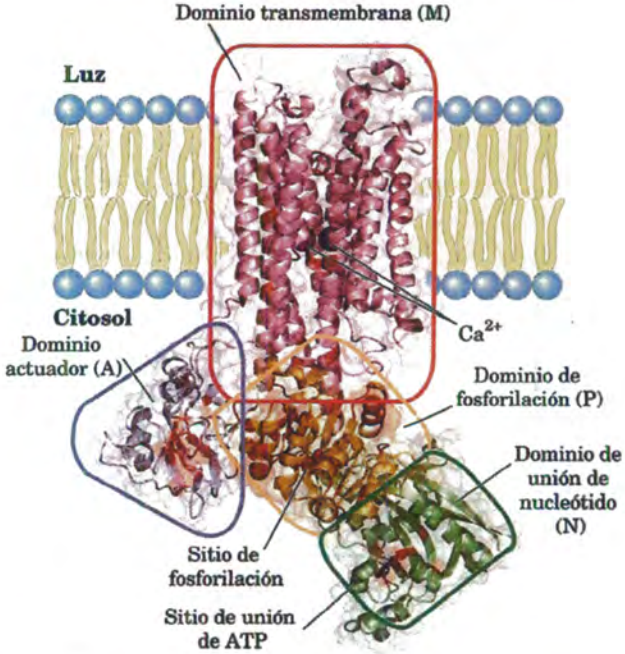


FIGURA 11–35 Estructura de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático: una bomba SERCA. (PDB ID 1EUL) Diez hélices transmembrana (dominio M encuadrado en rosa) rodean la ruta para el desplazamiento del Ca^{2+} a través de la membrana. Dos de las hélices están interrumpidas cerca del centro de la bicapa y sus regiones no helicoidales forman los sitios de unión de dos iones Ca^{2+} (púrpura). Los grupos carboxilato de un residuo Asp en una hélice y de un residuo Glu en otra forman parte de los sitios de fijación de Ca^{2+}. Desde el lado citoplasmático se extienden tres dominios globulares: el dominio N (unión de nucleótido; encuadrado en verde) tiene tres sitios de unión de ATP; el dominio P (fosforilación; círculo naranja) contiene el residuo Asp^{351} sometido a fosforilación reversible, y el dominio A (actuador; triángulo azul) interviene en los cambios estructurales que alteran la afinidad del sitio de unión de Ca^{2+} y su exposición al citosol o a la luz. Observe la gran distancia existente entre el sitio de fosforilación y el sitio de unión de Ca^{2+}. Esta estructura de la bomba SERCA es el prototipo de todas las ATPasas tipo P y contiene algunos residuos (en rojo) que están conservados en todos los miembros de la familia de ATPasas tipo P.

El mecanismo que se ha propuesto para las bombas SERCA **(Fig. 11–36)** tiene en cuenta los grandes cambios conformacionales y la fosforilación-desfosforilación del residuo Asp central del dominio P que tiene lugar en cada ciclo catalítico. Cada ciclo catalítico mueve dos iones Ca^{2+} a través de la membrana y convierte ATP en ADP y P_i. El papel de la unión e hidrólisis del ATP es llevar a cabo la interconversión de las dos conformaciones (E1 y E2) del transportador. En la conformación E1, los dos sitios de unión de Ca^{2+} están expuestos al lado citosólico del RE o del retículo sarcoplasmático y fijan Ca^{2+} con elevada afinidad. La unión del ATP y la fosforilación de Asp impulsan un cambio conformacional desde E1 a E2 en el que los sitios de unión de Ca^{2+} están expuestos ahora al lado de la luz de la membrana al tiempo que reduce grandemente su afinidad por el Ca^{2+}, lo que conduce a la liberación de Ca^{2+} a la luz. Con este mecanismo, la energía liberada por hidrólisis del ATP durante un ciclo de fosforilación-desfosforilación impulsa el Ca^{2+} a través de la membrana contra un gran gradiente electroquímico.

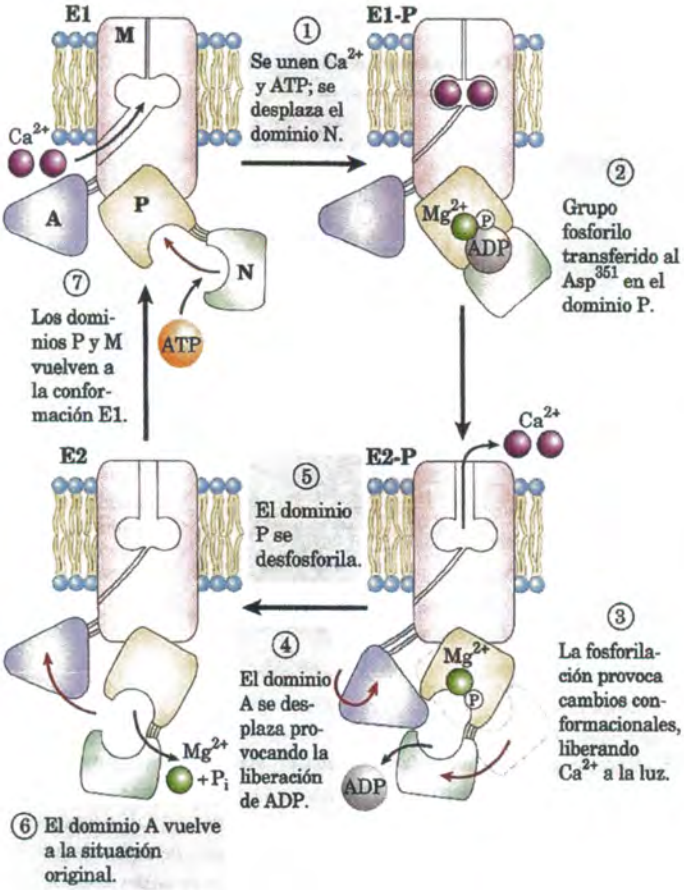


FIGURA 11–36 Mecanismo propuesto para la bomba SERCA. El ciclo de transporte empieza con la proteína en la conformación E1, con los sitios de unión de Ca^{2+} encarados hacia el citosol. Se unen los dos iones Ca^{2+}, a continuación se une el ATP al transportador y fosforila el Asp^{351}, formando E1–P. La fosforilación favorece la segunda conformación, E2–P, en la que los sitios de unión de Ca^{2+}, en este momento con una afinidad para el Ca^{2+} reducida, están accesibles en el otro lado de la membrana (la luz o espacio extracelular), y el Ca^{2+} liberado difunde. Finalmente, E2-P se desfosforila volviendo la proteína a la conformación E1 para otra ronda de transporte.

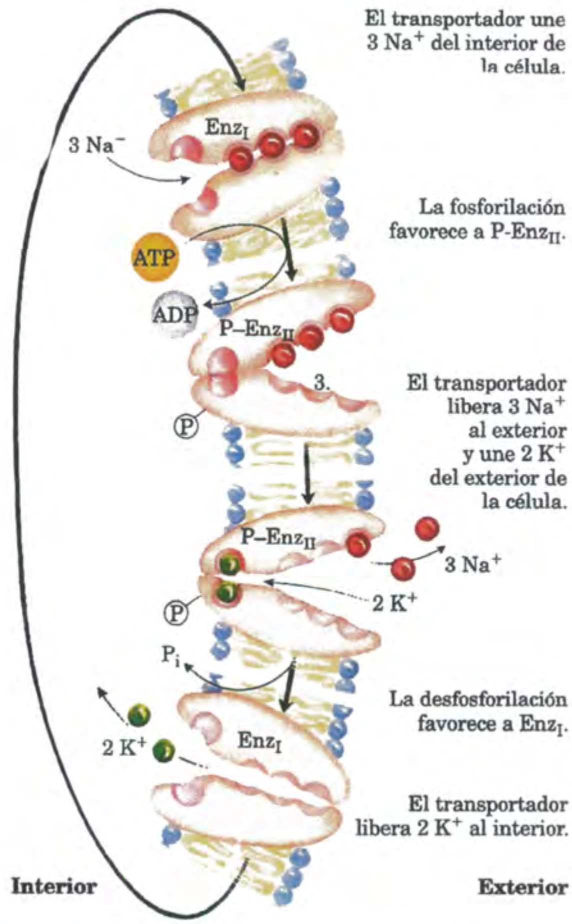


FIGURA 11–37 Mecanismo propuesto para el transporte de Na^+K^+ ATPasa.

Se observa una variación del mecanismo básico en la **Na^+K^+ ATPasa** de la membrana plasmática, descubierta por Jens Skou en 1957. Este cotransportador acopla la fosforilación-desfosforilación del residuo Asp al movimiento simultáneo de Na^+ y K^+ en contra de sus gradientes electroquímicos **(Fig. 11–37)**. La Na^+K^+ ATPasa es responsable de mantener concentraciones bajas de Na^+ y elevadas de K^+ en la célula con respecto al fluido extracelular **(Fig. 11–38)**. Por cada molécula de ATP convertida en ADP y P_i, el transportador mueve 2 iones K^+ hacia el interior y 3 iones Na^+ hacia el exterior a través de la membrana plasmática. El cotransporte es, por tanto, electrogénico —crea una separación neta de

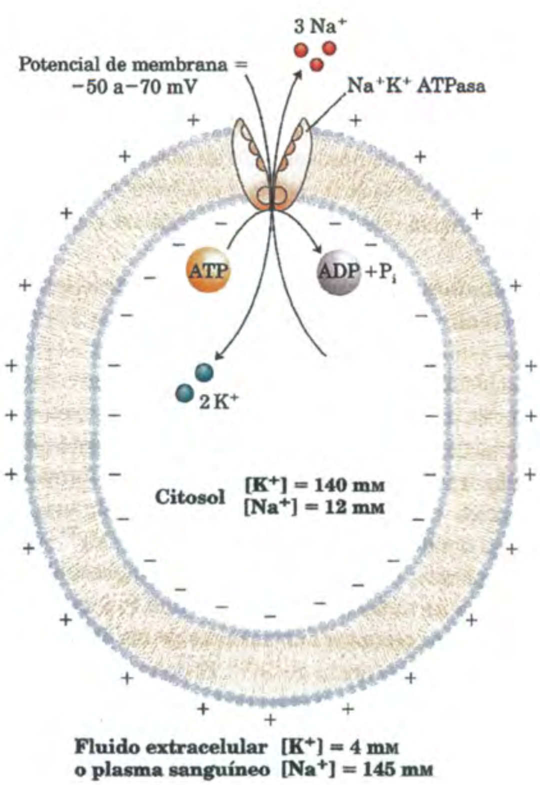


FIGURA 11–38 Papel de la Na^+K^+ ATPasa en células animales. En células animales, este sistema de transporte activo es responsable principalmente de establecer y mantener las concentraciones intracelulares de Na^+ y K^+ y de generar el potencial eléctrico transmembrana. Esto lo hace expulsando 3 Na^+ de la célula por cada 2 K^+ que introduce. El potencial eléctrico a través de la membrana plasmática es fundamental para la señalización eléctrica en las neuronas, y el gradiente de Na^+ es usado para impulsar el cotransporte de solutos cuesta arriba en muchos tipos celulares.

Jens Skou

carga a través de la membrana—; en los animales, esto produce el potencial de membrana de –50 a –70 mV (interior negativo en relación al exterior) que es característico de la mayoría de células y que es esencial para la conducción de potenciales de acción en las neuronas. El papel central de la Na^+K^+ ATPasa queda reflejado en la energía invertida en esta reacción sencilla: ¡alrededor del 25% del consumo total de energía de un ser humano en reposo!

Las ATPasas tipo F son bombas de protones reversibles impulsadas por el ATP

Los transportadores activos **ATPasa tipo F** catalizan el paso transmembrana contracorriente de protones impulsado por la hidrólisis del ATP. La designación "tipo F" viene de la identificación de estas ATPasas como factores de acoplamiento de energía. El complejo de proteína integral de membrana F_o (**Fig. 11–39**; el subíndice *o* denota su inhibición por el fármaco oligomicina) proporciona una ruta transmembrana para protones, y la proteína periférica F_1 (el subíndice *1* indica que fue el primero entre una serie de factores aislados de las mitocondrias) utiliza la energía del ATP para impulsar protones cuesta arriba (a una región de mayor concentración de H^+). La organización F_oF_1 de transportadores bombeadores de protones tiene que haberse desarrollado muy al principio de la evolución. Bacterias tales como *E. coli* utilizan un complejo F_oF_1 ATPasa en su membrana plasmática para bombear protones hacia el exterior mientras que las arqueas poseen una bomba de protones homóloga próxima, la A_oA_1 ATPasa.

La reacción catalizada por las ATPasas tipo F es reversible, por lo que un gradiente de protones puede suministrar la energía para impulsar la reacción inversa, la síntesis de ATP (**Fig. 11–40**). Cuando funcionan en esta dirección, las ATPasas tipo F se llaman más apropiadamente **ATP sintasas.** Las ATP sintasas son de importancia crucial en la producción de ATP por la mitocondria durante la fosforilación oxidativa y en los cloroplastos durante la fotofosforilación, tanto en bacterias como en arqueas. El gradiente de protones necesario para impulsar la síntesis de ATP se establece por otros tipos de bombas de protones cuyo poder proviene de la oxidación de sustratos o de la luz solar. Daremos una descripción detallada de estos procesos en el Capítulo 19.

Las **ATPasas tipo V,** una clase de ATPasas transportadoras de protones relacionadas estructuralmente (y, con toda probabilidad, mecánicamente) con las ATPasas tipo F, son responsables de la acidificación de los compartimientos intracelulares en muchos organismos (de ahí *V*, vacuolar). Las vacuolas de hongos y plantas superiores mantienen el pH entre 3 y 6, bastante inferior al del citosol circundante (pH 7,5), gracias a la acción de bombas protónicas de este tipo. Las ATPasas tipo V son también responsables de la acidificación de los lisosomas, endosomas, complejo de Golgi y vesículas secretoras en células animales. Todas las ATPasas del tipo V tienen una estructura compleja similar, con un dominio integral (transmembrana) (V_o) que actúa como un canal de protones y un dominio periférico (V_1) que contiene el sitio de unión de ATP y la actividad ATPasa. No se conoce en detalle el mecanismo por el que las ATPasas tipo V acoplan la hidrólisis del ATP con el transporte cuesta arriba de protones.

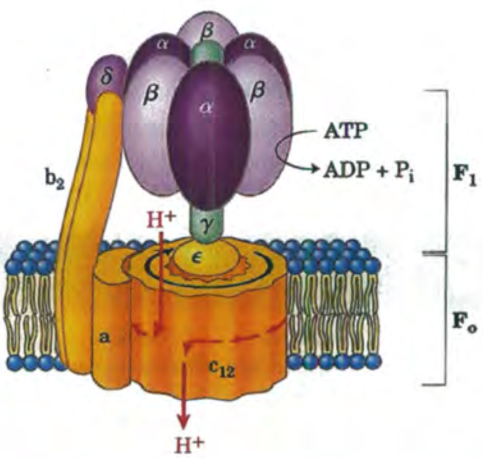


FIGURA 11–39 Estructura de la F_oF_1 ATPasa/ATP sintasa. Las ATPasas de tipo F tienen un dominio periférico, F_1, compuesto por tres subunidades α, tres subunidades β, una subunidad δ (púrpura) y un eje central (subunidad γ en verde) unido al dominio integral a través de ϵ. El dominio integral F_o (naranja) tiene múltiples copias de subunidades c (aquí se muestran 12), una subunidad a y dos subunidades b. F_o proporciona un canal transmembrana a través del cual se bombean unos cuatro protones (flechas rojas) por cada ATP hidrolizado en las subunidades β de F_1. El extraordinario mecanismo mediante el cual se acoplan estos dos acontecimientos se describe en detalle en el Capítulo 19. Interviene una rotación de F_o relativa a F_1 (flecha negra). Las estructuras de las ATPasas V_oV_1 y A_oA_1 son esencialmente similares a la de F_oF_1 y el mecanismo probablemente también lo es.

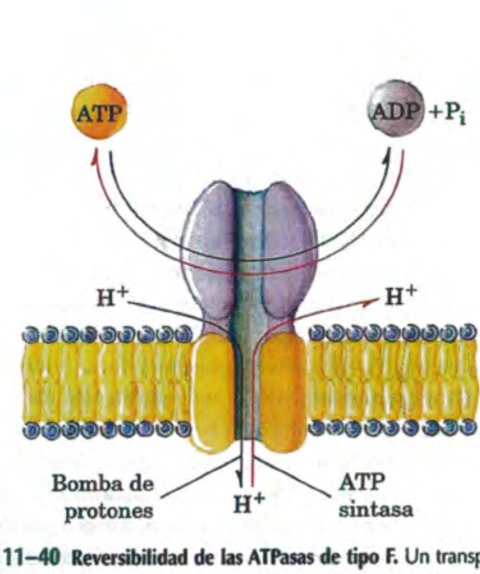


FIGURA 11–40 Reversibilidad de las ATPasas de tipo F. Un transportador de protones impulsado por ATP cataliza también la síntesis de ATP (flechas rojas) a medida que los protones fluyen *a favor* de su gradiente electroquímico. Ésta es la reacción central en los procesos de la fosforilación oxidativa y fotofosforilación descritos en detalle en el Capítulo 19.

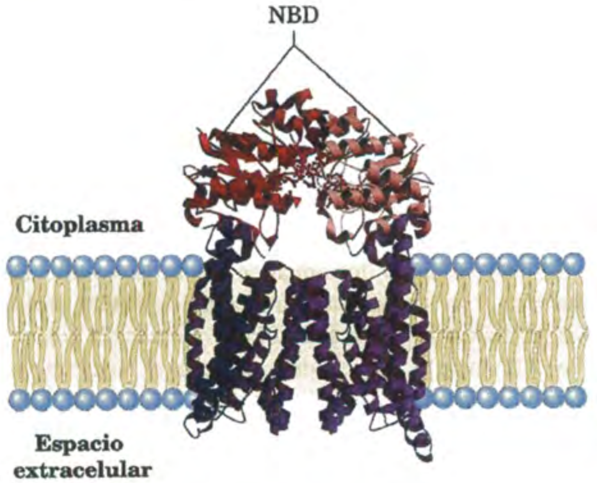


FIGURA 11–41 Estructuras de un transportador ABC de *E. coli*. El importador de vitamina B_{12} BtuCD (PDB ID 1L7V) es un homodímero con diez dominios helicoidales transmembrana (azul) en cada monómero y dos dominios de unión de nucleótido (NBD, en rojo) que se extienden hacia el citoplasma. Los residuos que intervienen en la unión e hidrólisis de ATP se muestran como estructuras de bolas y varillas.

Los transportadores ABC utilizan ATP para impulsar el transporte activo de una amplia gama de sustratos

Los **transportadores ABC (Fig. 11–41)** constituyen una extensa familia de transportadores dependientes de ATP que bombean aminoácidos, péptidos, proteínas, iones metálicos, diversos lípidos, sales biliares y muchos compuestos hidrofóbicos, fuera de las células contra un gradiente de concentración. Un transportador ABC en la especie humana, el **transportador multifármacos (MDR1),** es responsable de la extraordinaria resistencia de ciertos tumores a algunos fármacos antitumorales generalmente efectivos. MDR1 tiene una amplia especificidad de sustrato para compuestos hidrofóbicos, entre los que se cuentan, por ejemplo, los quimioterápicos adriamicina, doxorrubicina y vinblastina. Al bombear estos fármacos fuera de la célula, impide su acumulación dentro del tumor y bloquea sus efectos terapéuticos. MDR1 es una proteína integral de membrana (M_r 170.000) con 12 segmentos transmembrana y dos sitios de unión de ATP ("cassettes") que le dan nombre a la familia: transportadores ATP-binding cassette. ■

Todos los transportadores ABC tienen dos dominios de unión de nucleótidos (NBD) y dos dominios transmembrana. En algunos casos todos estos dominios se encuentran en un solo polipéptido largo; otros transportadores ABC tienen dos subunidades, cada una de las cuales aporta un NBD y un dominio con seis (o a veces 10; Fig. 11–41) hélices transmembrana. Aunque muchos de los transportadores ABC se encuentran en la membrana plasmática, algunos tipos también se encuentran en el retículo endoplasmático y en las membranas de las mitocondrias y lisosomas. La mayoría de transportadores ABC actúan como bombas, pero al menos algunos miembros de la superfamilia actúan como canales iónicos que se abren y cierran por hidrólisis del ATP. El transportador CFTR (véase el Recuadro 11–3) es un canal de Cl^- operado mediante hidrólisis del ATP.

Los NBD de todas las proteínas ABC son similares en secuencia y, quizá, en estructura tridimensional; son el motor molecular conservado que puede acoplarse muchas bombas y canales. Cuando están acoplados a una bomba, el motor impulsado por ATP transporta solutos contra un gradiente de concentración; cuando están acoplados a un canal iónico, el motor abre y cierra el canal usando ATP como fuente de energía. La estequiometría de las bombas ABC es de casi un ATP hidrolizado por molécula de sustrato transportada, pero no se conocen ni el mecanismo de acoplamiento ni el sitio de unión de sustrato.

Algunos transportadores ABC son muy específicos para un solo sustrato; otros son más promiscuos. El genoma humano tiene al menos 48 genes que codifican transportadores ABC; muchos actúan en el mantenimiento de la bicapa lipídica y en el transporte de esteroles, derivados de esteroles y ácidos grasos por todo el cuerpo. Las flipasas que desplazan lípidos de membrana desde una hoja de la bicapa a la otra son transportadores ABC al tiempo que la maquinaria celular que exporta el exceso de colesterol incluye un transportador ABC. Mutaciones en los genes que codifican algunas de estas proteínas contribuyen a la aparición de varias enfermedades genéticas, tales como la fibrosis quística (Recuadro 11–3), la enfermedad de Tangier (p. 843), la degeneración de la retina, la anemia y el fallo hepático.

Los transportadores ABC también se hallan presentes en animales más sencillos y en plantas y microorganismos. La levadura tiene 31 genes que codifican transportadores ABC, *Drosophila* tiene 56, y *E. coli* 80, lo que representa el 2% de su genoma completo. La presencia de transportadores ABC que confieren resistencia a antibióticos en microbios patógenos (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Neisseria gonorrhoeae* y *Plasmodium falciparum*) constituye una preocupación seria de salud pública al tiempo que convierte a estos transportadores en dianas atractivas en el diseño de medicamentos. ■

Los gradientes de iones proporcionan la energía para el transporte activo secundario

Los gradientes de iones formados por el transporte primario de Na^+ o H^+ pueden, a su vez, proporcionar la fuerza impulsora para el cotransporte de otros solutos. (Tabla 11–4). Muchos ti-

TABLA 11–4 Sistemas de cotransporte impulsados por gradientes de Na^+ o H^+

Organismo/ tejido/tipo celular	Soluto transportado (contra gradiente)	Soluto cotransportado (a favor de gradiente)	Tipo de transporte
E. coli	Lactosa	H^+	Paralelo
	Prolina	H^+	Paralelo
	Ácidos dicarboxílicos	H^+	Paralelo
Intestino, riñón (vertebrados)	Glucosa	Na^+	Paralelo
	Aminoácidos	Na^+	Paralelo
Células de vertebrados (muchos tipos)	Ca^{2+}	Na^+	Antiparalelo
Plantas superiores	K^+	H^+	Antiparalelo
Hongos (*Neurospora*)	K^+	H^+	Antiparalelo

RECUADRO 11–3 MEDICINA Un canal iónico defectuoso en la fibrosis quística

La fibrosis quística (CF) es una enfermedad hereditaria grave y relativamente común en humanos. Cerca de un 5% de los americanos blancos son portadores, al tener una copia del gen defectuosa y otra normal. Sólo los individuos con dos copias defectuosas muestran los síntomas graves de la enfermedad: obstrucción de los tractos gastrointestinal y respiratorio, que conduce normalmente a una infección bacteriana en los conductos aéreos y a la muerte por una insuficiencia respiratoria antes de los 30 años de edad. En la CF, la fina capa de mucosidad que normalmente cubre las superficies internas del pulmón es anormalmente gruesa, obstruyendo el flujo de aire y proporcionando un refugio para las bacterias patógenas, especialmente *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El gen defectuoso en los pacientes de CF se descubrió en 1989. Codifica una proteína de membrana llamada regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, o CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Esta proteína tiene dos segmentos; cada uno contiene seis hélices transmembrana, dos dominios de unión de nucleótidos (NBD) y una región reguladora (Fig. 1). El CFTR es, pues, muy parecido a otras proteínas transportadoras ABC. La proteína CFTR normal es un canal iónico específico para iones Cl^-. El canal conduce Cl^- a través de la membrana plasmática cuando los dos NBD tienen ATP unido y se cierra cuando el ATP de uno de los NBD es degradado a ADP y P_i. El canal de Cl^- también es regulado por fosforilación de varios residuos Ser del dominio regulador, catalizada por la proteína quinasa dependiente de cAMP (Capítulo 12). Cuando el dominio regulador no está fosforilado, se cierra el canal de Cl^-. La mutación responsable de la CF es en el 70% de los casos una deleción de un residuo Phe en la posición 508. La proteína mutante no se pliega bien, lo que interfiere con su inserción en la membrana plasmática con la consecuencia de que se reduce el transporte de Cl^- a través de la membrana plasmática de las células epiteliales que revisten los conductos aéreos (Fig. 2), el tracto digestivo y las glándulas exocrinas (páncreas, glándulas sudoríparas, conductos biliares y deferentes).

El descenso en la exportación de Cl^- va acompañado de una exportación menor de agua de las células con lo que la mucosidad presente en sus superficies se deshidrata, volviéndose espesa y muy pegajosa. Normalmente los cilios de las células epiteliales que recubren la cara interna del pulmón barren las bacterias que se depositan en esta mucosidad, pero el moco espeso de los individuos que sufren CF impide este proceso. El resultado son infecciones frecuentes por bacterias tales como *S. aureus* y *P. aeruginosa*, que dañan los pulmones y reducen la eficacia respiratoria. El fallo respiratorio es con mucha frecuencia la causa de muerte en individuos con CF.

FIGURA 2 La mucosidad que recubre la superficie de los pulmones atrapa bacterias. En pulmones sanos (mostrados aquí), esas bacterias son exterminadas y barridas por la acción de los cilios. En la CF, este mecanismo está deteriorado, provocando infecciones recurrentes y daño progresivo a los pulmones.

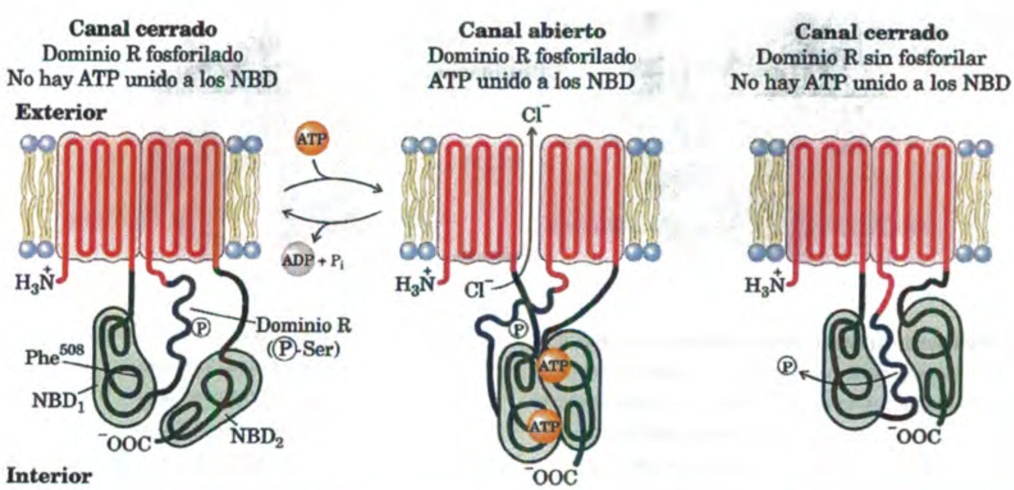


FIGURA 1 Tres estados del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, CFTR. La proteína tiene dos segmentos, cada uno con 6 hélices transmembrana, y tres dominios funcionalmente significativos que se extienden desde la cara citosólica: NBD_1 y NBD_2 (verde) son dominios que unen nucleótidos a los que se une el ATP, mientras que un dominio regulador (azul) es el sitio de la fosforilación por una proteína quinasa dependiente de cAMP. Cuando este dominio R está fosforilado pero no se ha unido ATP a los NBD (izquierda), el canal está cerrado. La unión de ATP abre el canal (centro) hasta que se hidroliza el ATP unido. Cuando el dominio regulador no está fosforilado (derecha), une los dominios NBD e impide la fijación de ATP y la apertura del canal. La mutación más corriente que conduce a la CF es la deleción de Phe^{508} en el dominio NBD_1 (izquierda). CFTR es un transportador ABC típico en todos los aspectos menos en dos: la mayoría de transportadores ABC carecen de dominio regulador y el CFTR actúa como un canal iónico (de Cl^-), a diferencia de un transportador típico.

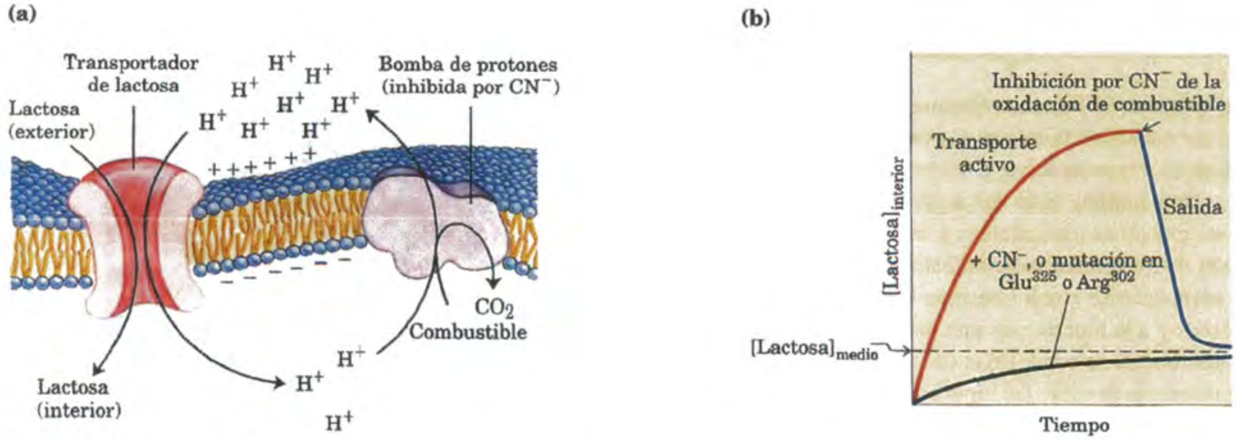


FIGURA 11–42 Captación de lactosa en *E. coli.* **(a)** El transporte primario de H^+ fuera de la célula, impulsado por la oxidación de una multitud de combustibles, establece tanto un gradiente protónico como un potencial eléctrico (negativo en el interior) a través de la membrana. El transporte activo secundario de lactosa al interior de la célula precisa un cotransporte paralelo de H^+ y lactosa por el transportador de lactosa. La captación de lactosa contra su gradiente de concentración depende enteramente de este flujo de protones hacia el interior impulsado por el gradiente electroquímico. **(b)** Cuando las reacciones de oxidación generadoras de energía del metabolismo se bloquean por cianuro (CN^-), el transportador de lactosa permite que se equilibren la lactosa de dentro y fuera de la célula vía transporte pasivo. Mutaciones que afectan a Glu^{325} o Arg^{302} tienen el mismo efecto que el cianuro. La línea a trazos representa la concentración de lactosa en el medio circundante.

pos de células contienen sistemas de transporte que acoplan el flujo espontáneo cuesta abajo de estos iones con el bombeo simultáneo cuesta arriba de otro ión, azúcar o aminoácido.

El **transportador de lactosa (lactosa permeasa)** de *E. coli* constituye el prototipo bien conocido de cotransportador impulsado por protones. Esta proteína consiste en una sola cadena polipeptídica (417 residuos) que funciona como monómero para transportar un protón y una molécula de lactosa al interior de la célula con acumulación neta de lactosa **(Fig. 11–42)**. *E. coli* produce normalmente un gradiente de protones y carga a través de su membrana plasmática gracias a la oxidación de combustibles y a la utilización de la energía de oxidación para bombear protones al exterior. (Este mecanismo se describe en detalle en el Capítulo 19.) La bicapa lipídica es impermeable a los protones, pero el transportador de lactosa proporciona una ruta para la reentrada de protones y la lactosa se transporta simultáneamente al interior de la célula por el cotransporte paralelo (simport). La acumulación endergónica de lactosa se acopla de este modo al flujo exergónico de protones al interior de la célula con una variación global de energía libre negativa.

El transportador de lactosa es un miembro de la **superfamilia facilitadora principal (major facilitator superfamily, MFS)** de transportadores que comprende 28 familias. Casi todas las proteínas de esta superfamilia tienen 12 dominios transmembrana (las pocas excepciones tienen 14). Las proteínas comparten relativamente poca homología de secuencia, pero la similitud de sus estructuras secundarias y la topología sugieren que tienen una estructura terciaria común. La resolución cristalográfica del transportador de lactosa de *E. coli* permite entrever esta estructura general **(Fig. 11–43a)**. La proteína tiene 12 hélices transmembrana y bucles de conexión que sobresalen hacia el citoplasma o el espacio periplasmático (entre la membrana plasmática y la membrana exterior o pared celular). Las seis hélices amino-terminales y las seis carboxi-terminales forman dominios muy similares y dan lugar a una estructura con una simetría binaria aproximada. En la forma cristalizada de la proteína hay una gran cavidad acuosa que está expuesta en el lado citoplasmático de la membrana. El sitio de unión del sustrato se encuentra en esta cavidad, más o menos en el centro de la membrana. El lado del transportador que mira hacia fuera (la cara periplasmática) está fuertemente cerrada sin

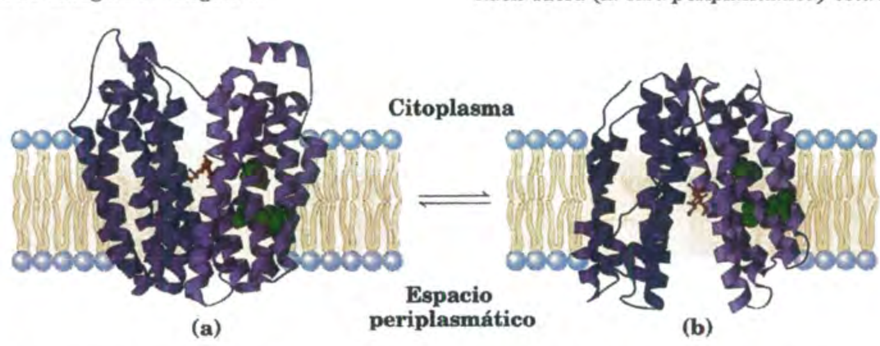


FIGURA 11–43 Transportador de lactosa (lactosa permeasa) de *E. coli.* **(a)** En la representación de cintas vista en paralelo al plano de la membrana se ven las 12 hélices transmembrana dispuestas en dos dominios casi simétricos que se muestran en diferentes tonos de púrpura. En la forma de la proteína para la que se determinó la estructura cristalina, el azúcar sustrato (rojo) está unido cerca del centro de la membrana, quedando expuesto al citosplasma (procedente de PDB ID 1PV7). **(b)** La segunda conformación postulada del transportador, relacionada con la primera por un cambio conformacional grande y reversible en el que el sitio de unión del sustrato se expone primero al periplasma (conformación de la derecha), en donde es captada la lactosa y después al citoplasma (conformación de la izquierda) en donde se libera la lactosa. La interconversión de las dos formas está impulsada por cambios en el apareamiento de cadenas laterales cargadas (que se pueden protonar) tales como las de Glu^{325} y Arg^{302} (verde) que están afectadas por el gradiente protónico transmembrana.

que haya un canal suficientemente grande para que entre la lactosa. El mecanismo propuesto para el paso transmembrana del sustrato (Fig. 11–43b) implica un movimiento oscilante entre los dos dominios, impulsado por la unión del sustrato y el movimiento de protones que exponen alternadamente el dominio de unión de sustrato al citoplasma y al periplasma. Este modelo, conocido como de "banana oscilante", es similar al mostrado en la Figura 11–31 para GLUT1.

¿Cómo se acopla el movimiento de H^+ hacia el interior de la célula con la captación de lactosa? Estudios genéticos extensos del transportador de lactosa han establecido que de los 417 residuos de la proteína, sólo 6 son esenciales para el cotransporte de H^+ y lactosa: algunos para la fijación de lactosa y otros para el transporte de protones. Mutaciones en cualquiera de los residuos (Glu^{325} y Arg^{302}; Fig. 11–43) dan como resultado una proteína que es aún capaz de catalizar la difusión facilitada de la lactosa pero que es incapaz de acoplar el flujo de H^+ para el transporte cuesta arriba de la lactosa. Puede observarse un efecto similar en células salvajes (sin mutar) cuando se bloquea su capacidad de generar un gradiente de protones con CN^-: el transportador lleva a cabo la difusión facilitada con normalidad pero no puede bombear lactosa contra un gradiente de concentración (Fig. 11–42b). Cambios en el apareamiento de cargas entre cadenas laterales afecta el equilibrio entre las dos conformaciones del transportador de lactosa.

En células epiteliales del intestino, la glucosa y ciertos aminoácidos se acumulan por cotransporte paralelo con Na^+, a favor del gradiente de Na^+ establecido gracias a la Na^+K^+ ATPasa de la membrana plasmática **(Fig. 11–44)**. La superficie apical de las células epiteliales del intestino está recubierta con microvilli, proyecciones largas y delgadas de la membrana plasmática que incrementan enormemente el área superficial expuesta al contenido del intestino. Los **cotransportadores paralelos de Na^+-glucosa** de la membrana plasmática apical captan glucosa del intestino en un proceso impulsado por el flujo cuesta abajo de Na^+:

$$2Na^+_{out} + \text{glucosa}_{out} \longrightarrow 2Na^+_{in} + \text{glucosa}_{in}$$

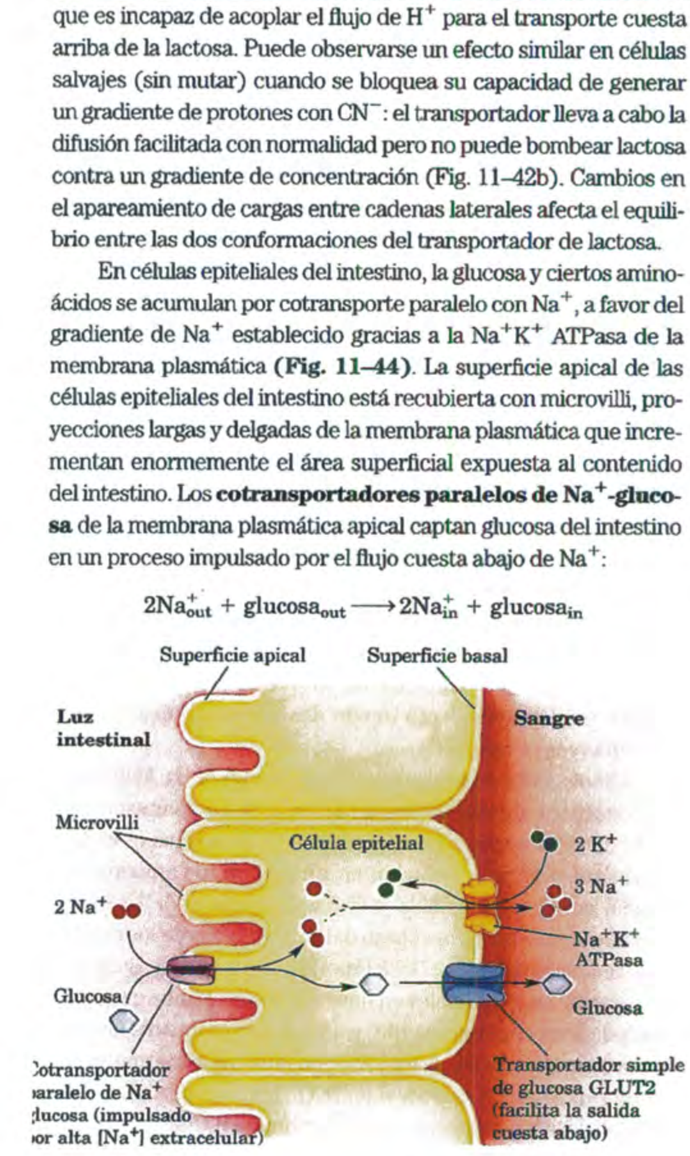


FIGURA 11–44 Transporte de glucosa en células del epitelio intestinal. La glucosa se cotransporta con Na^+ a través de la membrana plasmática apical al interior de la célula epitelial. Se desplaza a través de la célula hasta la superficie basal, donde pasa a la sangre vía GLUT2, un transportador pasivo simple de glucosa. La Na^+K^+ ATPasa continúa bombeando Na^+ hacia el exterior para mantener el gradiente de Na^+ que impulsa la captación de glucosa.

La energía requerida para este proceso proviene de dos fuentes: la mayor concentración de Na^+ fuera (potencial químico) y el potencial transmembrana (potencial eléctrico), que es negativo en el interior y que por lo tanto facilita la entrada de Na^+ hacia dentro.

EJEMPLO PRÁCTICO 11–3 Energía del bombeo por un contransportador paralelo

Calcule la razón máxima $\frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}}$ que puede obtener el transportador paralelo de Na^+-glucosa de la membrana plasmática de una célula epitelial cuando la $[Na^+]_{in}$ intracelular es de 12 mM, la $[Na^+]_{out}$ extracelular de 145 mM, el potencial de membrana es de –50 mV (negativo en el interior) y la temperatura es de 37 °C.

Solución: Utilizando la ecuación 11–4 (p. 396), podemos calcular la energía inherente en un gradiente electroquímico de Na^+, es decir, el coste que supone transportar un ión Na^+ contra este gradiente:

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[Na]_{out}}{[Na]_{in}} + Z\mathcal{J}\,\Delta\psi$$

Sustituimos a continuación los valores estándar de R, T y $\mathcal{J}$, y los valores dados para $[Na^+]$ (expresados en concentraciones molares), +1 para Z (porque Na^+ tiene una carga positiva) y 0,050 V para $\Delta\psi$. Observe que el potencial de membrana es −50 mV (negativo en el interior), por lo que la variación de potencial cuando un ión se traslada desde el interior al exterior es de 50 mV.

$$\begin{aligned}\Delta G_t &= (8{,}315\ \text{J/mol}\cdot\text{K})(310\ \text{K})\ln\frac{1{,}45\times10^{-1}}{1{,}2\times10^{-2}}\\ &\quad + 1(96.500\ \text{J/V}\cdot\text{mol})(0{,}050\ \text{V})\\ &= 11{,}2\ \text{kJ/mol}\end{aligned}$$

Esta ΔG_t es la energía potencial por mol de Na^+ en el gradiente de Na^+ que está disponible para bombear glucosa. Dado que pasan dos iones Na^+ a favor de su gradiente electroquímico al interior de la célula por cada molécula de glucosa transportada en el simport, la energía disponible para bombear 1 mol de glucosa es de 2 × 11,2 kJ/mol = 22,4 kJ/mol. Podemos calcular ahora la razón de concentración de glucosa que puede conseguirse con esta bomba (de la Ecuación 11–3, p. 396):

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}}$$

Reordenando y sustituyendo los valores de ΔG_t, R y T, nos da

$$\ln \frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}} = \frac{\Delta G_t}{R_\iota T} = \frac{22{,}4\ \text{kJ/mol}}{(8{,}315\ \text{J/mol}\cdot\text{K})(310\ \text{K})} = 8{,}69$$

$$\begin{aligned}\frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}} &= e^{8{,}69}\\ &= 5{,}94\times10^{3}\end{aligned}$$

Así, el cotransportador puede bombear glucosa hacia el interior hasta que su concentración dentro de las células epiteliales sea unas 6.000 veces la del exterior (en el intestino).

A medida que la glucosa se bombea desde el intestino a la célula epitelial en la superficie apical, se desplaza simultáneamente desde la célula hasta la sangre por transporte pasivo a través de un transportador de glucosa (GLUT2) de la superficie basal (Fig. 11–44). El papel crucial del Na^+ en los sistemas de cotransporte paralelo y antiparalelo tal como el sistema descrito requiere el bombeo continuo de Na^+ hacia el exterior para mantener el gradiente de Na^+ transmembrana.

Debido al papel esencial de los gradientes de iones en el transporte activo y en la conservación de la energía, los compuestos que colapsan los gradientes de iones a través de las membranas celulares son venenos eficaces, mientras que aquellos que son específicos para microorganismos infecciosos pueden servir como antibióticos. Una de tales sustancias es la valinomicina, un péptido cíclico pequeño que neutraliza la carga del K^+ al rodearlo con seis oxígenos carbonílicos **(Fig. 11–45)**. El péptido hidrofóbico actúa entonces como lanzadera transportando el K^+ a través de la membrana a favor de su gradiente de concentración, destruyéndolo. Los compuestos que lanzan iones a través de membranas de esta forma se denominan **ionóforos** ("portadores de iones"). Tanto la valinomicina como la monensina (un ionóforo transportador de Na^+) son antibióticos; matan células microbianas gracias a la destrucción de los procesos de transporte secundario y de las reacciones de conservación de la energía. La monensina es muy utilizada como agente antifúngico y antiparasitario. ■

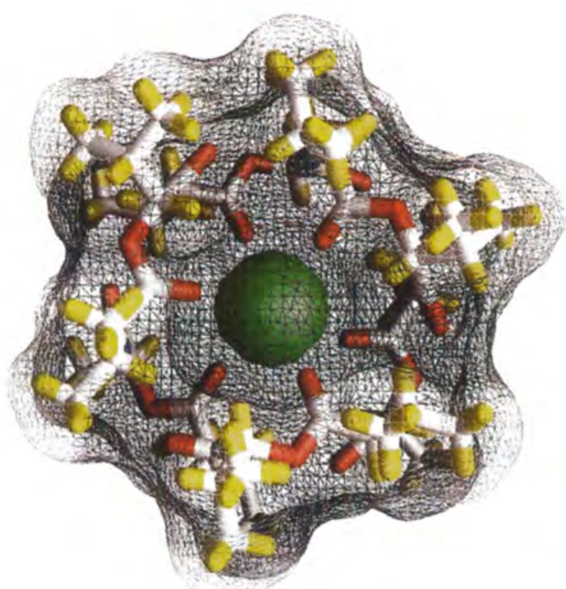


FIGURA 11–45 Valinomicina, un ionóforo peptídico que une K^+. En esta imagen, los contornos de superficie se muestran como un malla transparente, a través de la cual son visibles una estructura en varillas del péptido y un átomo de K^+ (verde). Los átomos de oxígeno (rojo) que unen K^+ forman parte de una cavidad hidrofílica central. Cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos (amarillo) recubren el exterior de la molécula. Debido a que el exterior del complejo K^+-valinomicina es hidrofóbico, el complejo difunde fácilmente a través de membranas, transportando K^+ a favor de su gradiente de concentración. La disipación del gradiente iónico transmembrana resultante mata las células microbianas, por lo que la valinomicina es un potente antibiótico.

Las acuaporinas forman canales transmembrana hidrofílicos para el paso de agua

Peter Agre

Una familia de proteínas integrales de membrana descubierta por Peter Agre, las **acuaporinas (AQP)**, proporcionan canales para el transporte rápido de moléculas de agua a través de la membrana plasmática. Se han descrito once acuaporinas en mamífero, cada una de ellas con una localización y función específicas (Tabla 11–5, p. 406). Los eritrocitos, que se hinchan o encogen rápidamente en respuesta a cambios bruscos en la osmolaridad extracelular cuando la sangre pasa a través de la médula renal, tienen una alta densidad de acuaporina en su membrana plasmática (2×10^5 moléculas de AQP-1 por célula). En el nefrón (unidad funcional del riñón) intervienen siete tipos diferentes de acuaporinas en la producción de orina y en la retención de agua. Cada AQP renal tiene una localización específica en el nefrón y cada una de ellas tiene propiedades específicas y características reguladoras. Por ejemplo, la AQP-2 de las células epiteliales del conducto colector renal está regulada por la vasopresina (también llamada hormona antidiurética): cuando el nivel de vasopresina es elevado se reabsorbe más agua en el riñón. Ratones mutantes que carecen del gen de la AQP-1 presentan una mayor excreción de orina (poliuria) y una menor capacidad de concentración de la orina, resultado de la menor permeabilidad al agua del túbulo próximo. En la especie humana, se han descrito AQP genéticamente defectuosas que son responsables de distintas enfermedades entre las que se incluye una forma relativamente rara de diabetes que va acompañada de poliuria (Recuadro 11–2).

Las acuaporinas se encuentran en todos los organismos. La planta *Arabidopsis thaliana* tiene 38 genes de AQP, lo que refleja el papel crítico del transporte de agua en la fisiología vegetal. Por ejemplo, los cambios en la presión de turgencia requieren un desplazamiento rápido del agua a través de una membrana (véase la p. 52).

Las moléculas de agua atraviesan el canal de la AQP-1 a una velocidad de aproximadamente $10^9\ s^{-1}$. En comparación, el número de recambio más alto conocido para un enzima es el de la catalasa, $4 \times 10^7\ s^{-1}$, y muchos enzimas tienen un número de recambio entre $1\ s^{-1}$ y $10^4\ s^{-1}$ (véase la Tabla 6–7). La baja energía de activación para el paso del agua a través de los canales de acuaporina ($\Delta G^{\ddagger} < 15$ kJ/mol) sugiere que el agua se mueve a través de los canales en una corriente continua en la dirección dictada por el gradiente osmótico. (Para una discusión sobre la ósmosis, véase la p. 52.) Las acuaporinas no permiten el paso de protones (iones hidronio, H_3O^+), que colapsarían los potenciales electroquímicos de las membranas. ¿Cuál es la base de esta extraordinaria selectividad?

Encontramos una respuesta en la estructura de AQP-1, determinada por análisis de difracción de rayos X. La AQP-1 **(Fig. 11–46a)** tiene cuatro monómeros idénticos (cada uno de M_r 28.000) y cada monómero forma un poro transmembrana con un diámetro suficiente para permitir el paso de moléculas de agua en fila india. Cada monómero tiene seis segmentos heli-

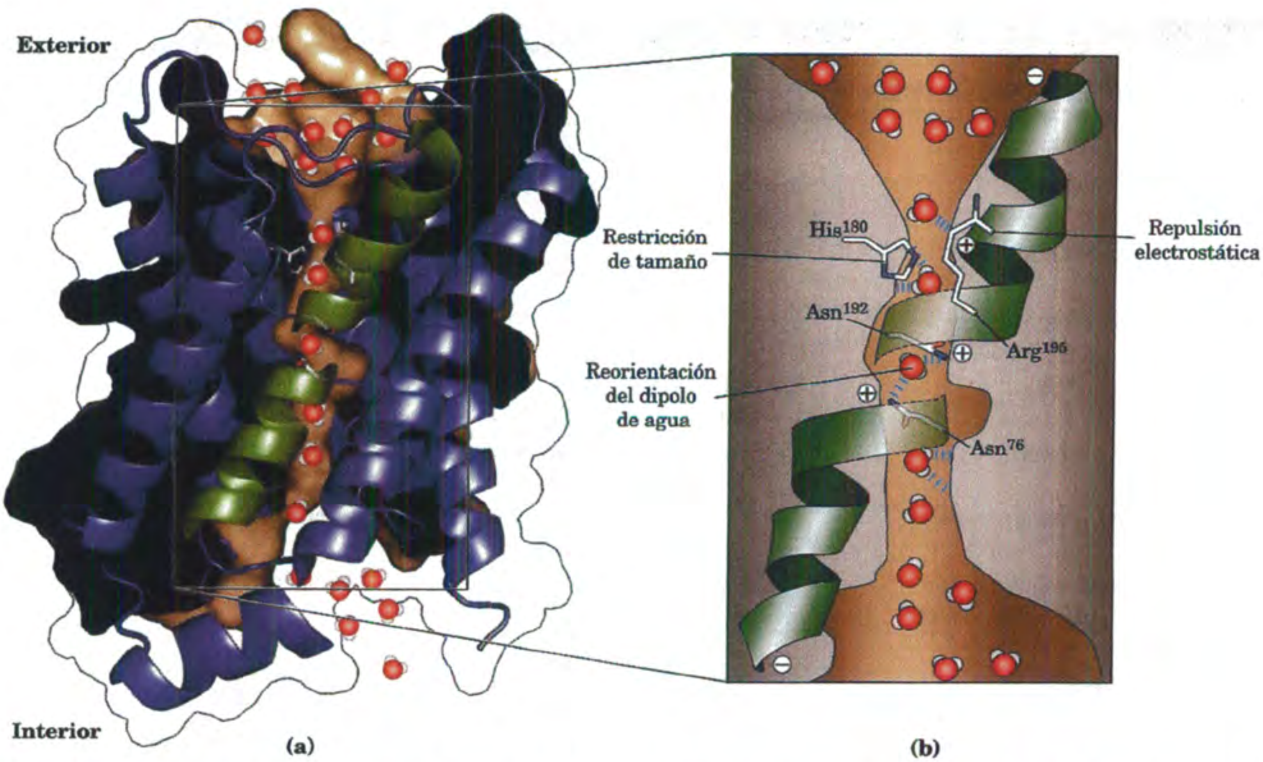


FIGURA 11–46 Acuaporina. La proteína es un tetrámero de subunidades idénticas, cada una de las cuales forma un poro transmembrana. **(a)** Un monómero de la acuaporina SoPIP2;1 de espinaca (procedente de PDB ID 2B5F) vista desde el plano de la membrana. Las hélices forman un poro central y dos segmentos helicoidales cortos (verde) contienen las secuencias Asn–Pro–Ala (NPA) que se encuentran en todas las acuaporinas y que forman parte del canal de agua. **(b)** Este dibujo (procedente de PDB ID 1J4N) de la acuaporina 1 bovina muestra que dicho poro (marrón; relleno de moléculas de agua, que se representan en rojo y blanco) se estrecha en His^{180} hasta un diámetro de 2,8 Å (aproximadamente el tamaño de una molécula de agua), limitando el paso de moléculas de tamaño superior al del H_2O. La carga positiva de Arg^{195} repele los cationes, incluido H_3O^+, e impide su paso a través del poro. Las dos hélices cortas mostradas en verde están orientadas con sus dipolos cargados positivamente apuntando al poro de tal manera que fuerzan una molécula de agua a reorientarse a medida que pasa a través del poro; esto rompe las cadenas de moléculas de agua unidas por puente de hidrógeno, lo que impide su paso por "salto de protones" (véase la Fig. 2–13).

coidales transmembrana y dos hélices más cortas cada una de las cuales contiene la secuencia Asn–Pro–Ala (NPA). Las seis hélices transmembrana forman el poro a través del monómero y los dos bucles cortos que contienen NPA se extienden hacia el centro de la bicapa desde lados opuestos. Sus regiones NPA se solapan en el centro de la membrana para formar parte de la especificidad del filtro, la estructura que permite que sólo pase agua (Fig. 11–46b).

El canal de agua se estrecha hasta un diámetro de 2,8 Å cerca del centro de la membrana, restringiendo severamente el tamaño de las moléculas que pueden viajar a través del canal. La carga positiva de un residuo Arg muy conservado en este cuello de botella impide el paso de cationes tales como H_3O^+. Los residuos que recubren el canal de cada monómero de AQP-1 son, generalmente, apolares, pero los oxígenos carbonílicos del esqueleto polipeptídico, que se proyectan hacia la parte estrecha del canal a intervalos, pueden formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua individuales que pasan a través del mismo; los dos residuos Asn (Asn^{76} y Asn^{192}) en los bucles NPA también forman puentes de hidrógeno con el agua. La estructura del canal no admite la formación de una cadena de moléculas de agua muy cercanas unas de otras ya que ello permitiría el salto de protones (véase la Fig. 2–13), lo cual transportaría de manera efectiva protones a través de la membrana. Los residuos críticos de Arg e His y los dipolos eléctricos formados por las hélices cortas de los bucles NPA proporcionan cargas positivas en posiciones que repelen cualquier protón que se hubiera podido escapar a través del poro y también impiden la formación de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua adyacentes.

Se ha descrito una acuoporina aislada de la espinaca con mecanismo de compuerta (abierta cuando dos residuos críticos de Ser cerca del extremo intracelular del canal están fosforilados y cerrada cuando están desfosforilados). Tanto la estructura abierta como la cerrada se han determinado por cristalografía. La fosforilación favorece una conformación que presiona dos residuos Leu y uno His cercanos hacia el canal, lo que bloquea el movimiento del agua después de este punto cerrando el canal de manera efectiva. Otras acuaporinas están reguladas de otras maneras que permiten cambios rápidos en la permeabilidad de la membrana al agua.

Aunque generalmente son muy específicas para el agua, algunas AQP también permiten que el glicerol o la urea pasen a altas velocidades (Tabla 11–5); se cree que estas AQP son importantes en el metabolismo del glicerol. Por ejemplo, la AQP-7, que se encuentra en las membranas plasmáticas de los adipocitos (células grasas), transporta el glicerol de manera eficiente. Los ratones con AQP-7 defectuosa desarrollan obesidad y diabetes de aparición adulta, probablemente como resultado de su

TABLA 11–5 Características de permeabilidad y distribución predominante de acuaporinas de mamífero

Acuaporina	Permeante (permeabilidad)	Distribución tisular	Distribución subcelular*
AQP-0	Agua (baja)	Cristalino	Membrana plasmática
AQP-1	Agua (alta)	Eritrocito, riñón, pulmón, endotelio vascular, cerebro, ojo	Membrana plasmática
AQP-2	Agua (alta)	Riñón, vas deferens	Membrana plasmática apical, vesículas intracelulares
AQP-3	Agua (alta), glicerol (alta), urea (moderada)	Riñón, piel, pulmón, ojo, colon	Membrana plasmática basolateral
AQP-4	Agua (alta)	Cerebro, músculo, riñón, pulmón, estómago, intestino delgado	Membrana plasmática basolateral
AQP-5	Agua (alta)	Glándula salivar, glándula lacrimal, glándula sudorípara, pulmón, córnea	Membrana plasmática apical
AQP-6	Agua (baja), aniones ($NO_3^- > Cl^-$)	Riñón	Vesículas intracelulares
AQP-7	Agua (alta), glicerol (alta), urea (alta), arsenito	Tejido adiposo, riñón, testículo	Membrana plasmática
AQP-8†	Agua (alta)	Testículo, riñón, hígado, páncreas, intestino delgado, colon	Membrana plasmática, vesículas intracelulares
AQP-9	Agua (baja), glicerol (alta), urea (alta), arsenito	Hígado, leucocito, cerebro, testículo	Membrana plasmática
AQP-10	Agua (baja), glicerol (alta), urea (alta)	Intestino delgado	Vesículas intracelulares

Fuente: Datos de King, L.S., Kozono, D., & Agre, P. (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev.* **5**, 688.

*Las acuaporinas presentes principalmente en la membrana apical o en la basolateral se clasifican como localizadas en una de estas membranas; las que están presentes en ambas membranas se clasifican como localizadas en la membrana plasmática.

†AQP-8 también podría ser permeada por urea.

incapacidad para transportar glicerol al interior o exterior de los adipocitos cuando los triacilgliceroles se convierten en ácidos grasos y glicerol, y viceversa.

Los canales selectivos de iones permiten el movimiento rápido de iones a través de las membranas

Inicialmente reconocidos en neuronas mientras que ahora se sabe que están presentes en las membranas plasmáticas de todas las células, así como en las membranas intracelulares de los eucariotas, los **canales selectivos de iones** proporcionan otro mecanismo para transportar iones inorgánicos a través de las membranas. Los canales iónicos, junto con las bombas de iones tales como la Na^+K^+ ATPasa, determinan la permeabilidad de una membrana plasmática a iones específicos y regulan la concentración citosólica de iones así como el potencial de membrana. En las neuronas, cambios muy rápidos en la actividad de los canales iónicos provocan cambios en el potencial de membrana (los potenciales de acción) que transportan señales desde el extremo de una neurona a otra. En los miocitos, la apertura rápida de los canales de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático libera el Ca^{2+} que desencadena la contracción muscular. Discutiremos las funciones de señalización de los canales iónicos en el Capítulo 12. Aquí describiremos las bases estructurales de la función de los canales iónicos, usando como ejemplos un canal de K^+ bacteriano regulado por voltaje, el canal neuronal de Na^+ y el canal iónico del receptor de acetilcolina.

Los canales iónicos se distinguen de los transportadores de iones en al menos tres cosas. Primero, la velocidad de flujo a través de los canales puede ser de varios órdenes de magnitud mayores que el número de recambio de un transportador (10^7 a 10^8 iones/s para un canal iónico, cercano al máximo teórico para la difusión no restringida). El contraste con el número de recambio de la Na^+K^+ATPasa de alrededor de 100 s^{-1} es altamente significativo. Segundo, los canales iónicos no se saturan; sus velocidades no se acercan a un máximo a una concentración de sustrato elevada. Tercero, son "compuertas", abiertas o cerradas en respuesta a algún proceso celular. En los **canales de compuerta regulada por ligando** (que son generalmente oligoméricos), la unión de una **pequeña** molécula extracelular o intracelular fuerza una transición alostérica de la proteína, que abre o cierra el canal. En los **canales iónicos de compuerta regulada por voltaje,** un dominio de una proteína cargada se mueve con relación a la membrana como respuesta a un cambio de potencial eléctrico transmembrana (V_m), abriendo o cerrando el canal. Los dos tipos de compuerta pueden ser muy rápidos. Un canal típico se abre en una fracción de milisegundo, y puede permanecer abierto sólo unos pocos milisegundos, haciendo que estos dispositivos moleculares sean efectivos para una transmisión muy rápida de señal en el sistema nervioso.

La función del canal iónico se mide eléctricamente

Debido a que un canal iónico sencillo normalmente se mantiene abierto durante unos cuantos milisegundos, el seguimiento de este proceso está más allá del límite de la mayoría de las medidas bioquímicas. El flujo de iones tiene que ser medido por lo tanto eléctricamente, ya sea como cambios en V_m (en la zona de milivoltios) o como corrientes eléctricas I (en microamperios o picoamperios), utilizando microelectrodos y amplificadores adecuados. En el patch-clamping, una técnica desarrollada por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976, se miden corrientes muy pequeñas a través de una minúscula región de la superficie de la membrana que contiene sólo una o unas pocas moléculas de canal iónico **(Fig. 11–47)**. Se pueden medir el tamaño y la duración de la corriente que fluye durante una apertura de un canal iónico y se puede medir con qué frecuencia se abre un canal y cómo queda afectada esta frecuencia por el potencial de membrana, los ligandos reguladores, las toxinas y otros agentes. Los estudios de patch-clamping han revelado que hasta 10^4 iones pueden pasar a través de un solo canal en un milisegundo. Este flujo iónico representa una enorme amplificación de la señal inicial; por ejemplo, sólo son necesarias dos moléculas de acetilcolina para abrir un canal receptor de acetilcolina (tal como se describe más adelante).

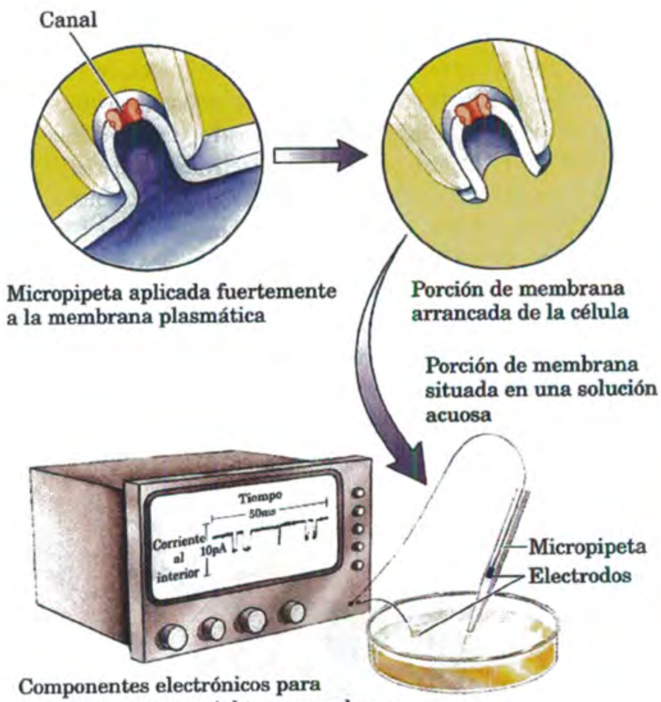


FIGURA 11–47 Mediciones eléctricas de la función de un canal iónico. La "actividad" de un canal iónico se determina midiendo el flujo de iones a través del mismo, usando la técnica de patch–clamp. Se presiona una micropipeta muy fina contra la superficie celular, y la presión negativa en la pipeta se usa para formar un sello de presión entre la pipeta y la membrana. Cuando la pipeta es retirada de la célula, arranca un pequeño trozo (patch) de membrana (que puede contener uno o varios canales iónicos). Cuando la pipeta y el trozo adherido se sitúan en una solución acuosa, se puede medir la actividad del canal en función de la corriente eléctrica que fluye entre los contenidos de la pipeta y la solución acuosa. En la práctica, se crea un circuito que "sujeta" (clamps) el potencial transmembrana a un valor dado y mide la corriente que debe fluir para mantener este voltaje. Con detectores de corriente muy sensibles, se puede medir la corriente que fluye a través de un canal iónico individual, que es, típicamente, de unos pocos picoamperios. La traza que muestra la corriente en función del tiempo (en milisegundos) revela la rapidez a la cual se abre y se cierra el canal, la frecuencia de apertura y el tiempo que permanece abierto. "Sujetando" el V_m a diferentes valores se consigue la determinación del efecto del potencial de membrana sobre estos parámetros de la función del canal.

Erwin Neher

Bert Sakmann

La estructura de un canal de K^+ muestra las bases de su especificidad

Roderick MacKinnon

La estructura de un canal de potasio de la bacteria *Streptomyces lividans*, determinada cristalográficamente por Roderick MacKinnonn en 1998, proporciona mucha información sobre el funcionamiento de los canales de iones. Este canal iónico bacteriano está relacionado en secuencia con todos los demás canales de K^+ conocidos y sirve como prototipo de dichos canales, incluidos los canales neuronales de K^+ de compuerta regulada por voltaje. Entre los miembros de esta familia de proteínas, las similitudes de secuencia son máximas en la "región del poro" que contiene un filtro de selectividad de ión que permite el paso de K^+ (radio 1,33 Å) 10.000 veces más fácilmente que el Na^+ (radio 0,95 Å) a una velocidad (unos 10^8 iones/s) cercana al límite teórico de la difusión libre.

El canal de K^+ está formado por cuatro subunidades idénticas que abarcan la membrana y forman un cono dentro de un cono rodeando el canal iónico, con el extremo ancho del doble cono mirando hacia el espacio extracelular **(Fig. 11–48)**. Cada subunidad tiene dos hélices α transmembrana y una tercera hélice más corta que contribuye a la región del poro. El cono externo está formado por una de las hélices transmembrana de cada subunidad. El cono interior, formado por las cuatro hélices transmembrana restantes, rodea el canal iónico y acuna el filtro de selectividad de ión.

Tanto la especificidad iónica como el alto flujo a través del canal son explicables a partir de lo que conocemos sobre la estructura del canal. En las superficies externa e interna de la membrana plasmática, los caminos de entrada al canal tienen

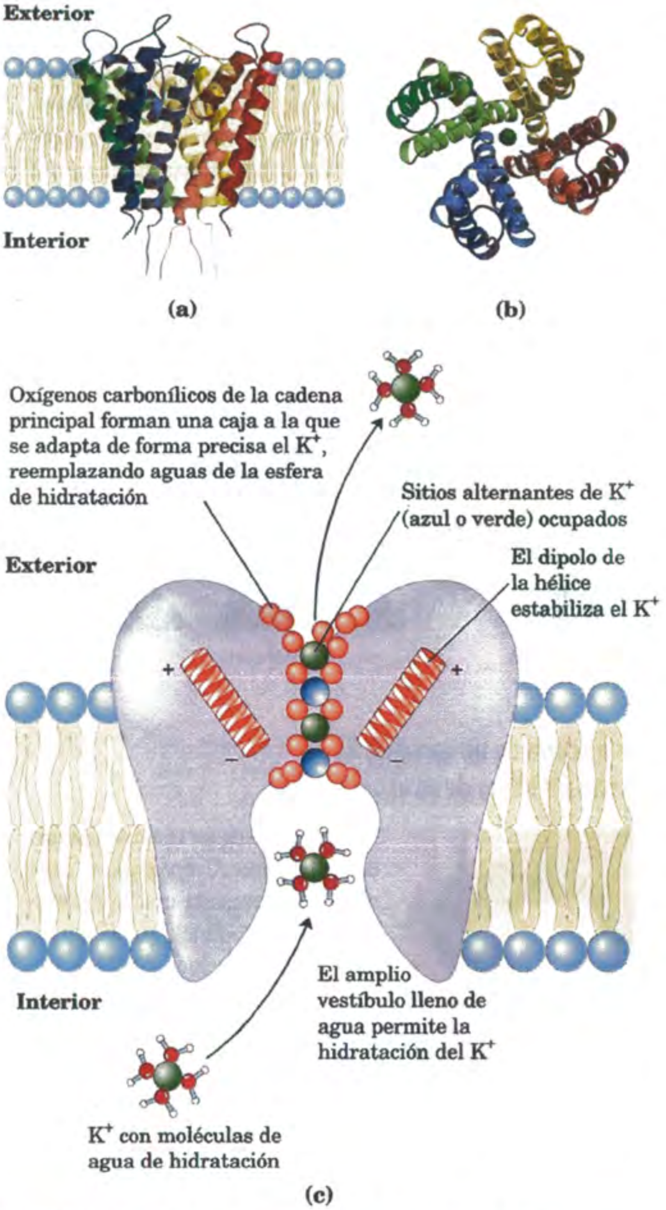


FIGURA 11–48 Canal de K^+ de *Streptomyces lividans*. (PDB ID 1BL8) **(a)** Visto en el plano de la membrana, el canal está formado por ocho hélices transmembrana (dos de cada una de las cuatro subunidades idénticas), formando un cono con su extremo ancho hacia el espacio extracelular. Las hélices internas del cono (de color más claro) revisten el canal transmembrana, mientras que las hélices externas interaccionan con la bicapa lipídica. Segmentos cortos de cada subunidad convergen en el extremo abierto del cono para formar un filtro selectivo. **(b)** Esta vista perpendicular al plano de la membrana muestra las cuatro subunidades dispuestas alrededor de un canal central lo suficientemente ancho como para que pase un único ión de K^+. **(c)** Diagrama de un canal de K^+ en sección transversal mostrando las características críticas para su función. (Véase también la Fig. 11–49.)

varios residuos aminoácidos con cargas negativas, que, presumiblemente, incrementan la concentración local de cationes tales como K^+ y Na^+. La ruta del ión a través de la membrana comienza (en la cara interna) como un canal ancho, relleno de agua en el que el ión puede mantener su esfera de hidratación. Se logra una mayor estabilización gracias a las hélices cortas en la región del poro de cada subunidad, con las cargas negativas parciales de sus dipolos eléctricos apuntando hacia el K^+ en el canal. Una vez pasados los dos tercios del camino a través de la membrana, este canal se estrecha en la región del filtro de selectividad obligando al ión a perder sus moléculas de agua de hidratación. Los átomos de oxígeno carbonílicos de la cadena principal del filtro de selectividad reemplazan las moléculas de agua de la esfera de hidratación, formando una serie de capas de coordinación perfectas a través de las cuales se mueve el K^+. Esta interacción favorable con el filtro no es posible para el Na^+, que es demasiado pequeño para establecer los contactos con todos los ligandos de oxígeno potenciales. La estabilización preferencial del K^+ es la base de la selectividad iónica del filtro por lo que mutaciones que cambian residuos en esta parte de la proteína eliminan la selectividad iónica del canal. Los sitios de unión de K^+ del filtro son suficientemente flexibles para colapsarse y encajar cualquier Na^+ que entre en el canal. Este cambio conformacional cierra el canal.

En el filtro de selectividad existen cuatro sitios potenciales de fijación de K^+ a lo largo del filtro de selectividad, cada uno de ellos formado por una "jaula" de oxígeno que proporciona ligandos para los iones K^+ **(Fig. 11–49)**. En la estructura cristalina son visibles dos K^+ dentro del filtro de selectividad, separados unos 7,5 Å, mientras que dos moléculas de agua se encuentran en las posiciones no ocupadas. Los iones K^+ pasan a través del filtro en fila india; muy probablemente sus repulsiones electrostáticas mutuas equilibran la interacción de cada ión con el filtro de selectividad manteniéndolos en movimiento. El desplazamiento de los dos iones K^+ es concertado: en primer lugar ocupan las posiciones 1 y 3, saltando después a las posiciones 2 y 4 (Fig. 11–48c). La diferencia energética entre estas dos configuraciones (1, 3 y 2, 4) es muy pequeña; energéticamente, el poro

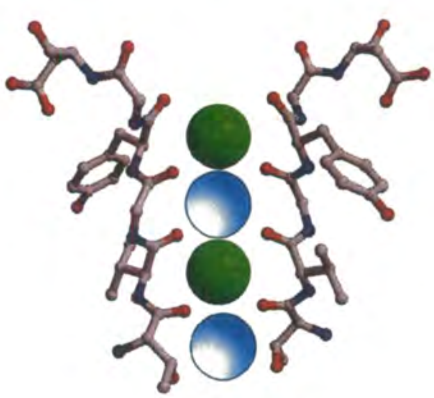


FIGURA 11–49 Sitios de unión de K^+ en el poro de selectividad del canal de K^+. (PDB ID 1J95) Los oxígenos carbonílicos (rojo) del esqueleto peptídico en el filtro de selectividad sobresalen en el canal, interaccionando con un ión K^+ que pasa por el mismo, estabilizándolo. Estos ligandos están posicionados perfectamente para interaccionar con cada uno de los cuatro iones K^+, pero no con los iones Na^+, que son más pequeños. Esta interacción preferencial con el K^+ constituye la base de la selectividad iónica. La repulsión mutua entre iones K^+ hace que sólo dos de los cuatro sitios de K^+ estén ocupados simultáneamente (los dos verdes o los dos azules) al tiempo que contrarresta la tendencia de un ión K^+ solitario a permanecer unido en un sitio. El efecto combinado de la unión de K^+ a oxígenos carbonílicos y la repulsión entre iones K^+ asegura que cada ión se mantenga en movimiento, cambiando posiciones en 10 a 100 ns, y que no existan barreras energéticas grandes para el flujo iónico a lo largo del paso a través de la membrana.

de selectividad no es un conjunto de colinas y valles sino una superficie plana que es ideal para el desplazamiento rápido de iones a través del canal. Parece que la estructura del canal se ha optimizado durante la evolución para dar velocidades de flujo máximas y alta especificidad.

Los canales de K^+ con regulación de compuerta por voltaje son estructuras más complejas que la que se muestra en la Figura 11–48, si bien constituyen variaciones sobre el mismo tema. Por ejemplo, en los mamíferos los canales de K^+ con regulación de compuerta por voltaje de la familia *Shaker* tienen un canal iónico como el del canal bacteriano que se muestra en la Figura 11–48, pero con dominios proteicos adicionales que actúan como sensores del potencial de membrana, se mueven en respuesta a un cambio de potencial y, al moverse, desencadenan la apertura o cierre del canal de K^+ **(Fig. 11–50)**. La hélice transmembrana crítica en el dominio sensor del voltaje de los canales de K^+ *Shaker* contiene cuatro residuos Arg; las cargas positivas de estos residuos hacen que la hélice se desplace en relación a la membrana como respuesta a cambios en el campo eléctrico transmembrana (el potencial de membrana).

Las células también tienen canales que conducen específicamente Na^+ o Ca^{2+} mientras que excluyen K^+. En cada caso, la capacidad de discriminación entre cationes requiere tanto una cavidad en el sitio de unión del tamaño justo (ni demasiado grande ni demasiado pequeña) para acomodar el ión como la colocación precisa dentro de la cavidad de los oxígenos carbonílicos que puedan reemplazar la capa de hidratación del ión. Este encaje se puede conseguir con moléculas de menor tamaño

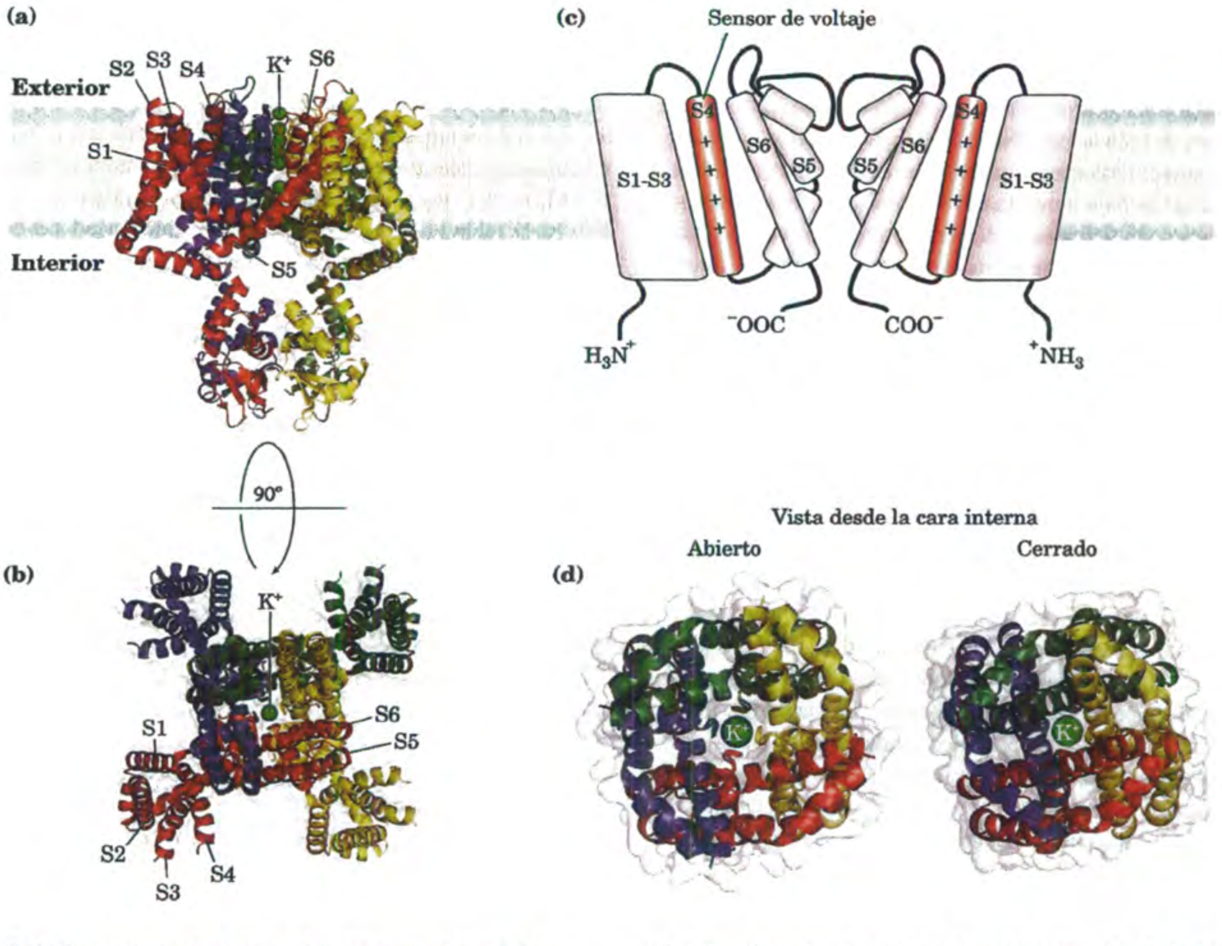


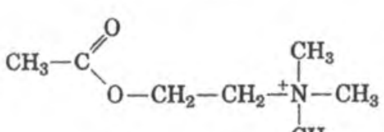
FIGURA 11–50 Bases estructurales del mecanismo de compuerta regulada por voltaje en el canal de K^+. (PDB ID 2A79) Esta estructura cristalina del complejo Kv1.2–subunidad $\beta 2$ de cerebro de rata muestra el canal básico de K^+ (correspondiente al mostrado en la Fig. 11–48) con la maquinaria extra necesaria para que el canal sea sensible a la compuerta por potencial de membrana: cuatro extensiones helicoidales transmembrana de cada subunidad y cuatro subunidades β. El complejo entero, visto **(a)** en el plano de la membrana y **(b)** perpendicular al plano de la membrana (tal como se ve desde el exterior de la membrana) se representa como en la Fig. 11–48, con cada subunidad de un color diferente; cada una de las cuatro subunidades β se colorea igual que la subunidad con la que se asocia. En **(b)** cada hélice transmembrana de una subunidad (rojo) se numera S1 hasta S6. S5 y S6 de cada una de las cuatro subunidades forma el propio canal y son comparables con las dos hélices transmembrana de cada subunidad en la Figura 11–48. S1 a S4 son cuatro hélices transmembrana. La hélice S4 contiene los residuos altamente conservados de Arg y se cree que consituye la parte móvil principal del mecanismo de percepción del voltaje. **(c)** Diagrama esquemático del canal regulado por voltaje que muestra la estructura básica del poro (centro) y las estructuras extra que permiten que el canal sea sensible al voltaje; S4, la hélice que contiene Arg, está en naranja. Para mayor claridad en esta vista no se muestran las subunidades β. Normalmente el potencial eléctrico transmembrana (negativo en el interior) estira las cadenas laterales cargadas positivamente de las Arg en S4 hacia el lado citosólico. Cuando la membrana está despolarizada la atracción disminuye y con la inversión completa del potencial de membrana, S4 es llevada hacia el lado extracelular. **(d)** Este movimiento de S4 está acoplado físicamente a la apertura y cierre del canal de K^+, que se muestra aquí en sus conformaciones abierta y cerrada. Aunque el K^+ está presente en el canal cerrado, el poro se cierra en la parte interior, cerca del citosol, impidiendo el paso de K^+.

que las proteínas; por ejemplo, la valinomicina (Fig. 11–45) puede proporcionar el encaje preciso que confiere elevada especificidad para la unión de un ión y no de otro. Los químicos han diseñado moléculas con una alta especificidad para la unión de Li^+ (radio 0,60 Å), Na^+ (radio 0,95 Å), K^+ (radio 1,33 Å) o Rb^+ (radio 1,48 Å). Las versiones biológicas (los canales proteicos) no sólo *fijan* específicamente sino que *conducen* los iones a través de las membranas mediante un mecanismo de *compuerta*.

Los canales iónicos de compuerta son básicos en la función neuronal

Prácticamente en toda señalización rápida entre las neuronas y sus tejidos diana (como, por ejemplo, el músculo) interviene la apertura y cierre rápidos de canales iónicos de la membrana plasmática. Por ejemplo, los canales de Na^+ de la membrana plasmática de las neuronas detectan el gradiente eléctrico transmembrana y responden a cambios con la apertura y el cierre. Estos canales iónicos de compuerta por voltaje son, típicamente, muy selectivos para Na^+ por encima de otros cationes monovalentes o divalentes (con factores de 100 o más) y tienen una velocidad de flujo muy alta (>10^7 iones/s). Cerrados, en estado de reposo los canales de Na^+ se abren (activan) por una reducción del potencial de membrana; a continuación experimentan una inactivación muy rápida. En cuestión de milisegundos después de la apertura, el canal se cierra y permanece inactivo durante muchos milisegundos. La activación seguida de la inactivación de los canales de Na^+ es la base de la señalización por las neuronas (véase la Fig. 12–25).

Otro canal iónico muy bien estudiado es el **receptor nicotínico de acetilcolina,** que interviene en el paso de una señal eléctrica desde una neurona motora a una fibra muscular en la unión neuromuscular (señala al músculo para que se contraiga). La acetilcolina liberada por la neurona motora difunde unos pocos micrómetros hacia la membrana plasmática de un miocito, donde se une al receptor de acetilcolina. Esto obliga a un cambio de conformación en el receptor, provocando la apertura de su canal iónico. El movimiento resultante de las cargas positivas hacia el interior del miocito despolariza su membrana plasmática, desencadenando la contracción. El receptor de acetilcolina permite que Na^+, Ca^{2+} y K^+ entren con igual facilidad a través de su canal, pero no pueden pasar otros cationes y ningún anión. El movimiento de Na^+ a través del canal iónico del receptor de acetilcolina es insaturable (su velocidad es lineal con respecto a la concentración extracelular de Na^+) y muy rápida, cerca de 2×10^7 iones/s en condiciones fisiológicas.



Acetilcolina

El canal del receptor de acetilcolina es característico de muchos otros canales iónicos que producen o responden a señales eléctricas: tiene una "compuerta" que se abre en respuesta a la estimulación por una molécula señal (en este caso acetilcolina) y un mecanismo intrínseco de temporización que cierra la compuerta al cabo de un instante. Así la señal de acetilcolina es transitoria, lo que es una característica esencial de la conducción de señales eléctricas.

Basándose en similitudes entre las secuencias de aminoácidos de otros canales iónicos de compuerta regulada por ligando y el receptor de acetilcolina, los canales receptores neuronales que responden a las señales extracelulares ácido γ-aminobutírico (GABA), glicina y serotonina se han agrupado en la superfamilia del receptor de acetilcolina; todos ellos comparten probablemente la estructura tridimensional y los mecanismos de compuerta. Los receptores $GABA_A$ y de glicina son canales aniónicos específicos para Cl^- o HCO_3^- mientras que el receptor de serotonina, al igual que el receptor de acetilcolina, es específico para cationes.

Otra clase de canales iónicos de compuerta regulada por ligando responde a ligandos *intracelulares*: guanosina 3′,5′ mononucleótido cíclico (cGMP) en el ojo de vertebrados, cGMP y cAMP en neuronas olfativas, y ATP e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) en muchos tipos celulares. Estos canales están compuestos por múltiples subunidades que contienen cada una seis dominios helicoidales transmembrana. Describiremos las funciones de señalización de estos canales iónicos en el Capítulo 12.

En la Tabla 11–6 se muestran algunos transportadores descritos en otros capítulos en las rutas en las que actúan.

Canales iónicos defectuosos pueden tener consecuencias fisiológicas adversas

La importancia de los canales iónicos en los procesos fisiológicos está clara a partir de los efectos de mutaciones en proteínas de canales iónicos específicos (Tabla 11–7, Recuadro 11–3). Los defectos genéticos en el canal de Na^+ de compuerta regulada por voltaje de la membrana plasmática del miocito conducen a enfermedades en las que los músculos periódicamente se paralizan (tal como sucede en la parálisis periódica hipercaliémica) o se vuelven rígidos (como en la paramiotonía congénita). La fibrosis quística es el resultado de una mutación que modifica un aminoácido en la proteína CFTR, un canal de iones Cl^-; aquí el proceso defectuoso no es la neurotransmisión, sino la secreción por varias células glandulares exocrinas cuyas actividades están ligadas a los flujos de ión Cl^-.

Muchas toxinas presentes en la naturaleza actúan a menudo sobre canales iónicos, y la potencia de estas toxinas ilustra aún más la importancia del normal funcionamiento de los canales iónicos. La tetrodoxina (producida por el pez globo, *Sphaeroides rubripes*) y la saxitoxina (producida por el dinoflagelado marino *Gonyaulax*, causante de las "mareas rojas") actúan uniéndose a los canales de Na^+ de compuerta regulada por voltaje de las neuronas impidiendo de este modo los potenciales de acción normales. El pez globo es un ingrediente de la exquisitez japonesa fugu, que sólo puede ser preparada por chefs entrenados especialmente para separar tan suculento bocado del veneno mortal. Comer marisco que se haya alimentado de *Gonyaulax* puede ser también fatal; el marisco no es sensible a la saxitoxina, pero la concentran en sus músculos, que pasan a ser altamente venenosos para organismos más arriba en la cadena alimentaria. El veneno de la serpiente mamba negra contiene dendrotoxina, que interfiere con canales de K^+ de entrada regu-

TABLA 11–6 Sistemas de transporte descritos en otras partes del libro

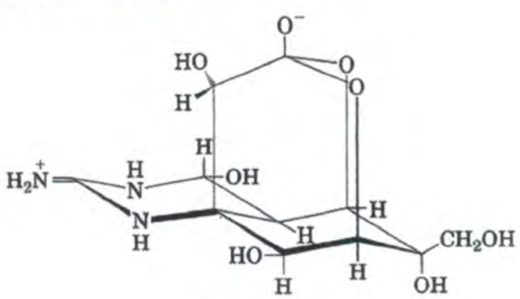
Sistema de transporte y localización	Número de figura	Función
Cotransportador antiparalelo de nucleótidos de la membrana mitocondrial interna	19–28	Importa el sustrato ADP para la fosforilación oxidativa y exporta el producto ATP
Transportador de acil-carnitina/carnitina de la membrana mitocondrial interna	17–6	Importa ácidos grasos a la matriz para la β oxidación
Cotransportador paralelo P_i-H^+ de la membrana mitocondrial interna	19–28	Suministra P_i para la fosforilación oxidativa
Transportador de malato–α-cetoglutarato de la membrana mitocondrial interna	19–29	Lanza equivalentes de reducción (en forma de malato) desde la matriz al citosol
Transportador de glutamato-aspartato de la membrana mitocondrial interna	19–29	Completa la acción iniciada por la lanzadera de malato–α-cetoglutarato
Transportador de citrato de la membrana mitocondrial interna	21–10	Proporciona citrato al citosol como fuente de acetil-CoA para la síntesis de lípidos
Transportador de piruvato de la membrana mitocondrial interna	21–10	Forma parte del mecanismo de la lanzadera de citrato desde la matriz al citosol
Transportador de ácidos grasos de la membrana plasmática del miocito	17–3	Importa ácidos grasos para ser utilizados como combustible
Complejos I, III y IV, transportadores de protones de la membrana mitocondrial interna	19–16	Actúa como mecanismo conservador de la energía en la fosforilación oxidativa, convirtiendo el flujo electrónico en un gradiente de protones
Termogenina (proteína desacopladora), un poro protónico de la membrana mitocondrial interna	19–34, 23–35	Permite la disipación del gradiente protónico de la mitocondria como medio de termogénesis y/o eliminación de exceso de combustible
Complejo citocromo *bf*, transportador de protones del tilacoide del cloroplasto	19–59	Actúa como bomba de protones, impulsada por flujo electrónico a través del esquema en Z; fuente de un gradiente de protones para la formación fotosintética de ATP
Bacteriorrodopsina, bomba de protones impulsada por la luz	19–66	Es la fuente del gradiente de protones impulsado por la luz para la síntesis de ATP en la bacteria halófila
F_oF_1 ATPasa/ATP sintasa de la membrana mitocondrial interna, tilacoide del cloroplasto y membrana plasmática bacteriana	19–64	Interconvierte la energía del gradiente de protones y del ATP durante la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación
Cotransportador antiparalelo P_i–triosa fosfato de la membrana interna del cloroplasto	20–15, 20–16	Exporta productos fotosintéticos desde el estroma; importa P_i para la síntesis de ATP
Transportador proteico bacteriano	27–44	Exporta proteínas secretadas a través de la membrana plasmática
Proteína translocasa del RE	27–38	Transporta proteínas al RE destinadas a la membrana plasmática, a la secreción o a orgánulos
Proteína translocasa del poro nuclear	27–42	Lanzadera de proteínas entre el núcleo y el citoplasma
Receptor de LDL en la membrana plasmática de células animales	21–42	Importa, mediante endocitosis facilitada por receptor, partículas transportadoras de lípidos
Transportador de glucosa de la membrana plasmática de células animales; regulado por insulina	12–16	Aumenta la capacidad del músculo y del tejido adiposo para captar exceso de glucosa de la sangre
Canal de Ca^{2+} regulado por IP_3 del retículo endoplasmático	12–10	Permite la señalización mediante cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+}
Canal de Ca^{2+} regulado por cGMP de los bastones y conos de la retina	12–36	Permite la señalización vía rodopsina unida a cAMP fosfodiesterasa en el ojo de vertebrados
Canal de Na^+ con compuerta regulada por voltaje de la neurona	12–25	Crea potenciales de acción en la transmisión de la señal neuronal

lada por voltaje. La tubocurarina, componente activo del curare (usado como veneno para flechas en el Amazonas) y otras dos toxinas de venenos de serpiente, cobrotoxina y bungarotoxina, bloquean el receptor de acetilcolina o impiden la abertura de su canal iónico. Al bloquear señales desde los nervios a los músculos, todas estas toxinas provocan parálisis y muy posiblemente la muerte. En el lado positivo, la extremadamente elevada afinidad de la bungarotoxina para el receptor de la acetilcolina

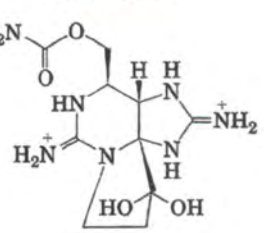
TABLA 11–7 Algunas enfermedades debidas a canales iónicos defectuosos

Canal iónico	Gen afectado	Enfermedad
Na^+ (compuerta por voltaje, músculo esquelético)	*SCN4A*	Parálisis periódica hipercaliémica (o paramiotonía congénita)
Na^+ (compuerta por voltaje, neuronal)	*SCN1A*	Epilepsia generalizada con ataques febriles
Na^+ (compuerta por voltaje, músculo cardíaco)	*SCN5A*	Síndrome 3 de largo QT
Ca^{2+} (neuronal)	*CACNA1A*	Migraña hemipléjica familiar
Ca^{2+} (compuerta por voltaje, retina)	*CACNA1F*	Ceguera nocturna estacionaria congénita
Ca^{2+} (policistina-1)	*PKD1*	Enfermedad renal poliquística
K^+ (neuronal)	*KCNQ4*	Sordera dominante
K^+ (compuerta por voltaje, neuronal)	*KCNQ2*	Convulsiones neonatales familiares benignas
Catión inespecífico (regulado por cGMP, retinal)	*CNCG1*	Retinitis pigmentosa
Receptor de acetilcolina (músculo esquelético)	*CHRNA1*	Síndrome miasténico congénito
Cl^-	*CFTR*	Fibrosis quística

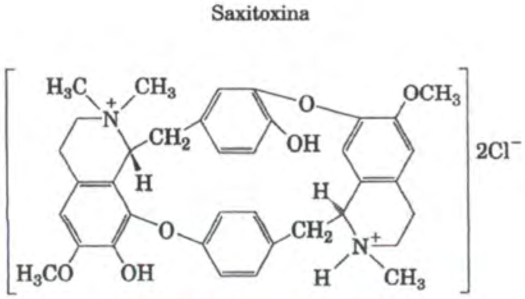
($K_d = 10^{-15}$ M) ha sido útil experimentalmente: la toxina marcada radiactivamente fue utilizada para cuantificar el receptor durante su purificación. ■



Tetrodotoxina



Saxitoxina



Cloruro de D-tubocurarina

RESUMEN 11.3 Transporte de solutos a través de membranas

- El movimiento de iones y de compuestos polares a través de las membranas biológicas requiere transportadores proteicos. Algunos transportadores sólo facilitan la difusión pasiva a través de la membrana desde el lado de mayor concentración al de concentración menor. Otros transportan solutos en contra de un gradiente electroquímico; ello requiere una fuente de energía metabólica.
- Los transportadores, al igual que los enzimas, presentan saturación y estereoespecificidad para sus sustratos. El transporte a través de estos sistemas puede ser pasivo o activo. El transporte activo primario está impulsado por ATP o por reacciones de transferencia electrónica; el secundario, por el flujo acoplado de dos solutos, uno de los cuales (a menudo H^+ o Na^+) fluye a favor de su gradiente electroquímico y el otro es impulsado en contra de su gradiente.
- Los transportadores GLUT, tales como GLUT1 de los eritrocitos, transportan glucosa al interior de las células por difusión facilitada. Estos transportadores son transportadores sencillos o uniport y acarrean un solo sustrato. Los cotransportadores paralelos o simport permiten el paso simultáneo de dos sustancias en la misma dirección; el transportador de lactosa de *E. coli* impulsado por la energía de un gradiente de protones (simport lactosa-H^+) y el transportador de glucosa de las células epiteliales del intestino, impulsado por un gradiente de Na^+ (simport glucosa-Na^+) son ejemplos de cotransportadores paralelos (simport). Los cotransportadores antiparalelos (antiport) facilitan el paso simultáneo de dos sustancias en direcciones opuestas; ejemplos de este tipo son el intercambiador de cloruro-bicarbonato de los eritrocitos y la Na^+K^+ ATPasa que es ubicua.
- En las células animales, la Na^+K^+ ATPasa mantiene las diferencias entre las concentraciones citosólica y extracelular de Na^+ y K^+. El gradiente de Na^+ se usa como fuente de energía para el transporte activo secundario.
- La Na^+K^+ ATPasa de la membrana plasmática y los transportadores de Ca^{2+} de los retículos sarcoplasmático y endoplasmático (las bombas SERCA) son ejemplos de ATPasas tipo P; experimentan fosforilación reversible durante su ciclo. Las bombas de protones ATPasa de tipo F (ATP sintasas) son fundamentales para los mecanismos de conservación de energía en mitocondrias y cloroplastos. Las ATPasas de tipo V producen gradientes de protones a través de diversas membranas intracelulares, entre ellas las membranas de las vacuolas en las plantas.

- Los transportadores ABC acarrean diversos sustratos (entre ellos muchos fármacos), fuera de las células, utilizando ATP como fuente de energía.
- Los ionóforos son moléculas liposolubles que unen iones específicos y los transportan pasivamente a través de las membranas, disipando la energía de gradientes iónicos electroquímicos.
- El agua se transporta a través de las membranas mediante acuaporinas. Algunas acuoporinas están reguladas; algunas también transportan glicerol o urea.
- Los canales iónicos proporcionan poros hidrofílicos a través de los cuales pueden difundir iones seleccionados, a favor de sus gradientes eléctricos o de concentración química. Tienen como característica su insaturabilidad así como niveles de flujo muy elevados. Muchos canales iónicos son sumamente específicos para un ión y la mayoría presentan un mecanismo de compuerta regulada por voltaje o por un ligando. El canal de Na^+ neuronal es de compuerta regulada por voltaje mientras que el canal iónico del receptor de acetilcolina está regulado por la acetilcolina que desencadena cambios de conformación que abren y cierran el paso transmembrana.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

modelo de mosaico fluido 373
micela 374
bicapa 374
proteínas integrales 375
proteínas periféricas 375
proteínas anfitrópicas 375
índice hidropático 378
barril β 379
fase de gel 381
estado líquido desordenado 381
estado líquido ordenado 381
flipasas 382
flopasas 383
escramblasas 383
FRAP 383
microdominios 384
balsas 384
caveolina 386
caveolas 386
proteínas de fusión 387
SNARE 388
difusión simple 390
potencial de membrana (V_m) 390
gradiente electroquímico 390
potencial electroquímico 390
difusión facilitada 390
transporte pasivo 390
transportadores 391
canales 391
electroneutro 395
sistemas de cotransporte 395
cotransporte antiparalelo (antiport) 395
cotransporte paralelo (simport) 395
transporte simple (uniport) 395
transporte activo 395
electrogénico 396
ATPasas tipo P 396
bomba SERCA 397
ATPasas tipo F 399
ATP sintasa 399
ATPasas tipo V 399
transportadores ABC 400
ionóforos 404
acuaporinas (AQPs) 404
canal iónico 406

Bibliografía

Composición y arquitectura de membranas

Boon, J.M. & Smith, B.D. (2002) Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. *Med. Res. Rev.* **22**, 251–281.
Revisión a nivel intermedio de la asimetría de los fosfolípidos y los factores que influyen en ella.

Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipids diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199–232.

Ediden, M. (2002) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 414–418.
Revisión corta de cómo se desarrolló y confirmó la noción de una membrana formada por una bicapa lipídica.

Haltia, T. & Freire, E. (1995) Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 295–322.
Buena discusión sobre la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de membrana y de los factores que las estabilizan.

Von Heijne, G. (2006) Membrane protein topology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 909–918.

White, S.H., Ladokhin, A.S., Jayasinghe, S., & Hristova, K. (2001) How membranes shape protein structure. *J. Biol. Chem.* **276**, 32,395–32,398.
Breve revisión a nivel intermedio de las fuerzas que moldean las hélices transmembrana.

Wimley, W.C. (2003) The versatile β barrel membrane protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 1–8.
Revisión a nivel intermedio.

Dinámica de membranas

Arnaout, M.A., Mahalingam, B., & Xiong, J.-P. (2005) Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 381–410.

Brown, D.A. & London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111–136.

Daleke, D.L. (2007) Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* **282**, 821–825.
Revisión a nivel intermedio.

Deveaux, P.F., Lopez-Montero, I., & Bryde, S. (2006) Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. *Chem. Phys. Lipids* **141**, 119–132.

Didier, M., Lenne, P.-F., Rigneault, H., & He, H.-T (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J.* **25**, 3446–3457.
Revisión a nivel intermedio sobre estudios de dinámica de membranas con sondas fluorescentes y de otros tipos.

Edidin, M. (2003) The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257–283.
Revisión avanzada.

Frye, L.D. & Ediden, M. (1970) The rapid intermixing of cell-surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* **7**, 319–335.
La demostración clásica de la movilidad de las proteínas de membrana.

Graham, T.R. (2004) Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends Cell Biol.* **14**, 670–677.
Revisión a nivel intermedio de la función de la flipasa.

Jahn, R. & Scheller, R.H. (2006) SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Cell Mol. Biol.* **7**, 631–643.
Excelente revisión a nivel intermedio del papel de las SNARE en la fusión de membranas y sobre el propio mecanismo de fusión.

Janmey, P.A. & Kunnunen, P.K.J. (2006) Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol.* **16**, 538–546

Linder, M.E. & Deschenes, R.J. (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 74–84.

Marguet, D., Lenne, P.-F., Rigneault, H., & He, H.-T. (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J.* **25**, 3446–3457.

Revisión a nivel intermedio de los métodos y resultados de estudios sobre mociones moleculares en la membrana.

Mayer, A. (2002) Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 289–314.

Revisión avanzada de la fusión de membranas, con énfasis en las características generales conservadas.

Palsdottir, H. & Hunte, C. (2004) Lipids in membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 2–18.

Parton, R.G. (2003) Caveolae—from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 162–167.

Revisión histórica concisa sobre caveolas, caveolina y balsas.

Parton, R.G. & Simons, K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 185–194.

Phillips, S.E., Vincent, P., Rizzieri, K.E., Schaaf, G., & Bankaitis, V.A. (2006) The diverse biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 21–49.

Revisión avanzada sobre el papel de estas proteínas en la señalización de lípidos y en el tráfico a través de membranas.

Pomorski, T., Holthuis, J.C.M., Herrmann, A., & van Meer, G. (2004) Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J. Cell Sci.* **117**, 805–813.

Sprong, H., van der Sluijs, P., & van Meer, G. (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *N. R. Mol. Cell Biol.* **2**, 504–513.

Revisión a nivel intermedio.

Tamm, L.K. (ed.). (2005) *Protein-Lipid Interactions: From Membrane Domains to Cellular Networks*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A.M., & Sandvig, K. (2003) Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol.* **13**, 92–100.

Yeagle, P.L. (ed.). (2004) *The Structure of Biological Membranes*, 2nd edn, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Zimmerberg, J. & Kozlov, M.M. (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 9–19.

Transportadores

Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., & Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* **301**, 610–615.

Fujiyoshi, Y., Mitsuoka, K., de Groot, B.L., Philippsen, A., Grubmüller, H., Agre, P., & Engel, A. (2002) Structure and function of water channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 509–515.

Jorgensen, P.L., Håkansson, K.O., & Karlish, S.J.D. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 817–849.

Kjellbom, P., Larsson, C., Johansson, I., Karlsson, M., & Johanson, U. (1999) Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* **4**, 308–314.

Revisión a nivel intermedio.

Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 282–295.

Revisión a nivel intermedio muy bien ilustrada.

Mueckler, M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* **219**, 713–725.

Schmitt, L. & Tampé, R. (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 754–760.

Stokes, D.L. & Green, N.M. (2003) Structure and function of the calcium pump. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 445–468.

Revisión avanzada.

Sui, H., Han, B.-G., Lee, J.K., Walian, P., & Jap, B.K. (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414**, 872–878.

Estructura a alta resolución de la acuaporina por cristalografía de rayos X.

Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **430**, 529–535.

Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T. (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogs. *Nature* **432**, 361–368.

El material suplementario disponible en la versión online de este artículo incluye una película excelente del posible mecanismo de compuerta.

Watson, R.T. & Pessin, J.E. (2006) Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 215–222.

Revisión a nivel intermedio de la regulación del transporte de glucosa a través de GLUT4.

Canales iónicos

Ashcroft, F.M. (2006). From molecule to malady. *Nature* **440**, 440–447.

Revisión breve sobre los muchos casos conocidos en los que defectos genéticos en los canales iónicos producen enfermedades en humanos.

Doyle, D.A., Cabral, K.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., & MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69–77.

Artículo que describe la primera estructura cristalina de un canal iónico.

Edelstein, S.J. & Changeux, J.P. (1998) Allosteric transitions of the acetylcholine receptor. *Adv. Prot. Chem.* **51**, 121–184.

Discusión avanzada de los cambios de conformación inducidos por la acetilcolina.

Gadsby, D.C., Vergani, P., & Csanady, L. (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477–483.

Este artículo constituye una de las siete excelentes revisiones sobre canales iónicos publicadas conjuntamente en este número de *Nature*.

Gouaux, E. & MacKinnon, R. (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* **310**, 1461–1465.

Revisión breve de las características arquitectónicas de los canales y bombas que confieren a cada proteína su especificidad iónica.

Guggino, W.B. & Stanton, B.A. (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nature Rev. Molec. Cell Biol.* **7**, 426–436.

Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd edn, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Texto a nivel intermedio que hace hincapié en la función de los canales iónicos.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel. *Nature* **423**, 33–41.

King, L.S., Kozono, D., & Agre, P. (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 687–698.

Revisión a nivel intermedio de la localización de las acuaporinas en tejidos de mamífero y efecto de los defectos de las acuaporinas sobre la fisiología.

Lee, A.G. & East, J.M. (2001) What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem J.* **356**, 665–683.

Long, S.B., Campbell, E.B., & MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent *Shaker* family K^+ channel. *Science* **309**, 897–902.

Long, S.B., Campbell, E.B., & MacKinnon, R. (2005) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**, 903–908.

Estos dos artículos de Long y coautores describen los estudios estructurales que condujeron a modelos de detección y acción de compuerta de voltaje en el canal de K^+.

Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., & Unwin, N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949–955.

Revisión a nivel intermedio.

Neher, E. & Sakmann, B. (1992) The patch clamp technique. *Sci. Am.* (March) **266**, 44–51.

Clara descripción de las técnicas electrofisiológicas usadas para medir la actividad de un canal iónico individual, por sus descubridores, ganadores del premio Nobel.

Sheppard, D.N. & Welsh, M.J. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, S23–S46.

Una de las 11 revisiones en este número de la revista sobre el canal de cloruro CFTR; los autores cubren la estructura, actividad, regulación, biosíntesis y patofisiología.

Shi, N., Ye, S., Alam, A., Chen, L., & Jiang, Y. (2006) Atomic structure of a Na^+- and K^+-conducting channel. *Nature* **440**, 427–429.

Estudio cristalográfico de un canal iónico que admite tanto Na^+ como K^+ y explicación estructural de su doble especificidad.

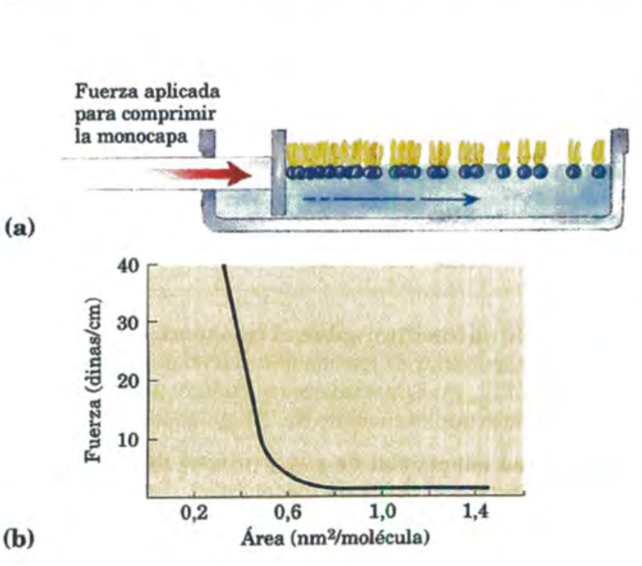
Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y. (2006) How does voltage open an ion channel? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 23–52.

Revisión avanzada de los mecanismos de compuerta regulada por voltaje de los canales iónicos.

Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* **419**, 35–42.

Problemas

1. Determinación del área de la sección transversal de una molécula de lípido Cuando los fosfolípidos se extienden cuidadosamente sobre la superficie del agua, se orientan en la interfase aire-agua con sus grupos de cabeza en el agua y sus colas hidrofóbicas en el aire. El aparato experimental **(a)** se ha diseñado de tal manera que reduce el área superficial disponible a una capa de lípidos. Midiendo la fuerza necesaria para apretar los lípidos, es posible determinar en qué momento las moléculas están empaquetadas compactamente en una monocapa continua; cuando se está próximo a esta área, la fuerza necesaria para reducir aún más el área superficial aumenta bruscamente **(b)**. ¿Cómo utilizaría este aparato para determinar el área media ocupada por una sola molécula de lípido en la monocapa?



2. Pruebas sobre la bicapa lipídica En 1925, E. Gorter y F. Grendel utilizaron un aparato como el descrito en el Problema 1 para determinar el área superficial de una monocapa lipídica formada por lípidos extraídos de eritrocitos de diversas especies animales. Utilizaron un microscopio para medir las dimensiones de las células individuales a partir de las que calcularon el área superficial media de un eritrocito. Obtuvieron los datos que se muestran en la tabla. ¿Estaba justificado que estos investigadores concluyeran que los "cromocitos [eritrocitos] estaban cubiertos por una capa de sustancias grasas que tiene dos moléculas de espesor" (es decir, una bicapa lipídica)?

Animal	Volumen de las células (mL)	Número de células (por mm^3)	Área superficial total de la monocapa de las células (m^2)	Área superficial total de un eritrocito (μm^2)
Perro	40	8.000.000	62	98
Oveja	10	9.900.000	6,0	29,8
Humano	1	4.740.000	0,92	99,4

Fuente: Datos de Gorter, E. & Grendel, F. (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* **41**, 439–443.

3. Número de moléculas de detergente por micela Cuando una pequeña cantidad del detergente dodecil sulfato sódico (SDS; $Na^+CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^-$) se disuelve en agua, los iones del detergente entran en la solución en forma de especies monoméricas. A medida que se añade más detergente, se alcanza una concentración (concentración micelar crítica) a la que los monómeros se asocian para formar micelas. La concentración micelar crítica del SDS es 8,2 mM. Las micelas tienen una masa de partícula media (la suma de las masas moleculares de los monómeros constituyentes) de 18.000. Calcule el número de moléculas de detergente en una micela media.

4. Propiedades de los lípidos y de las bicapas lipídicas Las bicapas lipídicas formadas entre dos fases acuosas tienen esta importante propiedad: forman hojas bidimensionales, cuyos bordes se colocan muy cercanos uno del otro para poder autosellarse y formar una vesícula (liposoma).

(a) ¿Qué propiedades de los lípidos son responsables de esta propiedad de las bicapas? Explíquelo.

(b) ¿Qué consecuencias tiene esta propiedad en lo que se refiere a la estructura de las membranas biológicas?

5. Longitud de una molécula de ácido graso La longitud del enlace carbono-carbono para carbonos unidos por enlace sencillo tal como los que se dan en una cadena acilo graso saturada es de unos 1,5 Å. Calcule la longitud de una molécula individual de palmitato en su forma totalmente extendida. Si se dispusieran cola con cola dos moléculas de palmitato, ¿cómo sería su longitud total en relación con el espesor de la bicapa lipídica de una membrana biológica?

6. Dependencia de la difusión lateral respecto a la temperatura El experimento descrito en la Figura 11–17 se realizó a 37 °C de temperatura. Si el experimento se hubiese llevado a cabo a 10 °C ¿qué efecto esperaría sobre la velocidad de difusión? ¿Por qué?

7. Síntesis del jugo gástrico: Energética El jugo gástrico (pH 1,5) se produce por bombeo de HCl del plasma sanguíneo (pH 7,4) al estómago. Calcule la cantidad de energía libre necesaria para concentrar el H^+ en 1 L de jugo gástrico a 37 °C. En las condiciones celulares, ¿cuántos moles de ATP deben hidrolizarse para proporcionar esta cantidad de energía libre? La variación de energía libre para la hidrólisis del ATP en condiciones celulares es aproximadamente de −58 kJ/mol (tal como

explicaremos en el Capítulo 13). Ignore los efectos del potencial eléctrico transmembrana.

8. Energética de la Na⁺K⁺ATPasa Para una célula típica de vertebrado con un potencial de membrana de −0,070 V (interior negativo), ¿cuál es la variación de energía libre para transportar 1 mol de Na^+ fuera de la célula hacia la sangre a 37 °C? Considere que la concentración de Na^+ en el interior de la célula es 12 mM y la del plasma sanguíneo es 145 mM.

9. Acción de la ouabaína en tejido de riñón La ouabaína inhibe específicamente la actividad de la Na^+K^+ ATPasa de tejidos animales pero no se sabe que inhiba ningún otro enzima. Cuando se añade ouabaína a láminas delgadas de tejido de riñón vivo, inhibe el consumo de oxígeno en un 66%. ¿Por qué? ¿Qué nos dice esta observación sobre la utilización de la energía respiratoria por el tejido renal?

10. Energética del cotransporte paralelo Suponga que determina experimentalmente que un sistema de transporte de glucosa celular, impulsado por un cotransportador paralelo de Na^+, puede acumular glucosa hasta concentraciones 25 veces superiores a la del medio externo, mientras que la $[Na^+]$ externa era sólo diez veces mayor que la $[Na^+]$ intracelular. ¿Violaría esto las leyes de la termodinámica? En caso negativo, ¿cómo podría explicar esta observación?

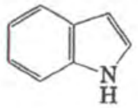
11. Localización de una proteína de membrana Se han efectuado sobre una proteína de membrana desconocida, X, las siguientes observaciones. Puede ser extraída a partir de membranas de eritrocito rotas en una solución salina concentrada, y puede ser cortada en fragmentos por enzimas proteolíticos. El tratamiento de los eritrocitos con enzimas proteolíticos seguido de rotura y extracción de los componentes de la membrana rinde X intacta. Sin embargo, el tratamiento de los "fantasmas" (ghosts) de eritrocito (que consisten únicamente en membranas plasmáticas, producidas al romper las células y eliminar la hemoglobina) con enzimas proteolíticos seguido de la rotura y extracción da X extensamente fragmentada. ¿Qué indican estas observaciones sobre la localización de X en la membrana plasmática? ¿Las propiedades de X se parecen a las de una proteína de membrana integral o a las de una proteína periférica?

12. Autosellado de la membrana Las membranas celulares son autosellantes (si son agujereadas o rotas mecánicamente, se vuelven a sellar automática y rápidamente). ¿Qué propiedades de las membranas son las responsables de esta importante característica?

13. Temperaturas de fusión de lípidos Los lípidos de membrana en muestras de tejidos obtenidos de diferentes partes de la pata de un reno tienen diferente composición de ácidos grasos. Los lípidos de membrana del tejido cercano a la pezuña contienen una proporción mayor de ácidos grasos insaturados que los de tejidos de la parte superior de la pata. ¿Cuál es el significado de esta observación?

14. Difusión flip-flop La cara interna (monocapa) de la membrana de un eritrocito humano está constituida predominantemente por fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. La cara externa está formada predominantemente por fosfatidilcolina y esfingomielina. Aunque los componentes fosfolipídicos de la membrana pueden difundir en la bicapa fluida, esta diferencia entre una cara y otra se mantiene siempre. ¿Cómo?

15. Permeabilidad de la membrana A pH 7, el triptófano cruza una bicapa lipídica unas 1.000 veces más lentamente de como lo hace el indol, una sustancia estrechamente relacionada:



Sugiera una explicación para esta observación.

16. Flujo de agua a través de una acuaporina Cada eritrocito humano tiene unos 2×10^5 monómeros de AQP-1. Si las moléculas de agua fluyen a través de la membrana plasmática a una velocidad de 5×10^8 moléculas de H_2O por tetrámero de AQP-1 por segundo, y el volumen de un eritrocito es de 5×10^{-11} mL, ¿cuánto tardaría un eritrocito en reducir a la mitad su volumen cuando encuentra la alta osmolaridad (1 M) del fluido intersticial de la médula renal? Suponga que el eritrocito está formado únicamente por agua.

17. Marcado del transportador de lactosa El transportador de lactosa de una bacteria, que es altamente específico para su sustrato lactosa, contiene un residuo de Cys que es esencial para su actividad de transporte. La reacción covalente de la *N*-etilmaleimida (NEM) con este residuo de Cys inactiva irreversiblemente al transportador. Una elevada concentración de lactosa en el medio impide la inactivación por NEM, probablemente al proteger estéricamente el residuo de Cys, que está en el sitio de unión a lactosa o cerca de él. No conoce nada más de la proteína transportadora. Sugiera un experimento que le permita determinar la M_r del polipéptido transportador que contiene Cys.

18. Predicción de la topología de una proteína de membrana a partir de la secuencia Ha clonado el gen de una proteína de eritrocito humano, que sospecha que es una proteína de membrana. A partir de la secuencia nucleotídica del gen, conoce la secuencia aminoácida. Partiendo de esta secuencia solamente, ¿cómo evaluaría la posibilidad de que la proteína fuera una proteína integral? Suponga que se demuestra que la proteína es una proteína integral, de tipo I o de tipo II. Sugiera experimentos bioquímicos o químicos que le permitan determinar de qué tipo se trata.

19. Captación intestinal de leucina Está estudiando la captación de L-leucina por células epiteliales de intestino de ratón. Mediciones de la velocidad de captación de L-leucina y de varios de sus análogos, con y sin Na^+ en el tampón de ensayo, dan los resultados que se muestran en la tabla. ¿Qué puede concluir sobre las propiedades y el mecanismo del transportador de leucina? ¿Esperaría que la captación de L-leucina fuera inhibida por ouabaína?

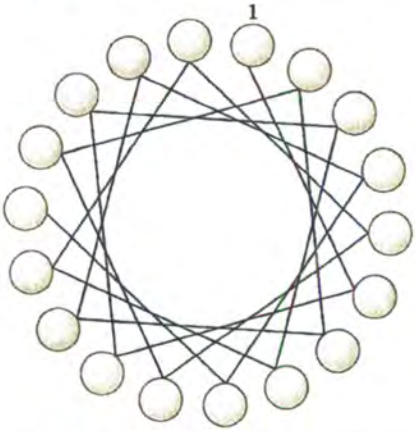
	Captación en presencia de Na^+		Captación en ausencia de Na^+	
Sustrato	V_{max}	K_t (mM)	V_{max}	K_t (mM)
L-Leucina	420	0,24	23	0,2
D-Leucina	310	4,7	5	4,7
L-Valina	225	0,31	19	0,31

20. Efecto de un ionóforo sobre el transporte activo Considere el transportador de leucina descrito en el Problema 19. ¿Cambiarían V_{max} y/o K_t si añadiese un ionóforo de Na^+ a la solución de ensayo que ya contiene Na^+? Explíquelo.

21. Densidad superficial de una proteína de membrana Se puede inducir a *E. coli* para que sintetice cerca de 10.000

copias del transportador de lactosa (M_r 31.000) por célula. Suponga que *E. coli* es un cilindro de 1 μm de diámetro y 2 μm de longitud. ¿Qué fracción de la superficie de la membrana plasmática está ocupada por las moléculas de transportador de lactosa? Explique cómo ha llegado a esta conclusión.

22. Utilización del diagrama de la rueda helicoidal Una rueda helicoidal es una representación bidimensional de una hélice vista a lo largo del eje central (véase la Fig. 11–29b; véase también la Fig. 4–4d). Utilice el diagrama de la rueda helicoidal siguiente para determinar la distribución de residuos aminoácidos en un segmento helicoidal con la secuencia –Val–Asp–Arg–Val–Phe–Ser–Asn–Val–Cys–Thr–His–Leu–Lys–Thr–Leu–Gln–Asp–Lys–



¿Qué puede decir acerca de las propiedades superficiales de esta hélice? ¿Cómo cree que estaría orientada la hélice en la estructura terciaria de una proteína integral de membrana?

23. Especies moleculares en la membrana de *E. coli* La membrana plasmática de *E. coli* está formada aproximadamente por 75% de proteína y 25% de fosfolípido en peso. ¿Cuántas moléculas de lípido de membrana están presentes por cada molécula de proteína de membrana? Suponga una M_r promedio para la proteína de 50.000 y una M_r promedio de 750 para el fosfolípido. ¿Qué más necesitaría saber para calcular la fracción de la superficie de membrana cubierta por lípidos?

Bioquímica en Internet

24. Topología de proteínas de membrana El receptor de la hormona adrenalina en células animales es una proteína integral de membrana (M_r 64.000) que se cree que tiene siete regiones que abarcan la membrana.

(a) Demuestre que una proteína de este tamaño es capaz de cruzar la membrana siete veces.

(b) Dada la secuencia de aminoácidos de esta proteína, ¿cómo predeciría qué regiones de la proteína forman las hélices que cruzan la membrana?

(c) Vaya a la web del Protein Data Bank (www.rcsb.org). Use el identificador PDB 1DEP para obtener la página de datos para una porción del receptor β-adrenérgico (un tipo de receptor de adrenalina) de pavo. Usando Jmol para explorar la estructura, prediga si esta porción del receptor está localizada dentro de la membrana o en la superficie de la membrana. Explíquelo.

(d) Recupere los datos para una porción de otro receptor, el receptor de acetilcolina de neuronas y miocitos, usando el identificador PDB 1A11. Al igual que en (c), prediga dónde se encuentra esta porción del receptor y explique su respuesta.

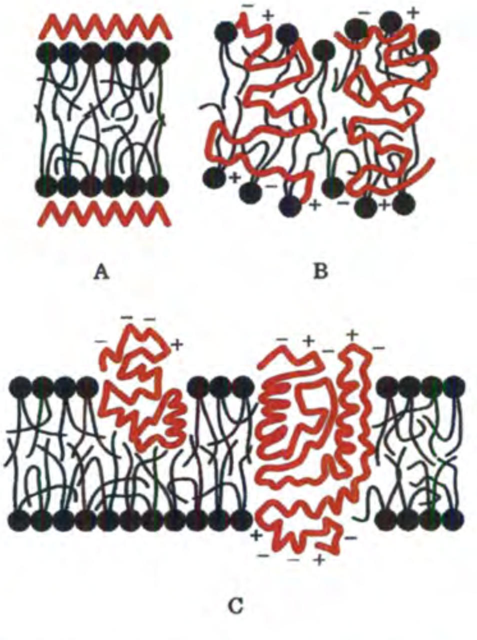
Si no ha usado el PDB, vea el Recuadro 4–4 (p. 129) para más información.

Problema de análisis de datos

25. El modelo de mosaico fluido de la estructura de las membranas biológicas La Figura 11–3 muestra el modelo de mosaico fluido de la estructura de las membranas biológicas tal como se acepta actualmente. Este modelo se presentó en detalle en un artículo de revisión de S. J. Singer en 1971. En este artículo, Singer presentó los tres modelos de estructura de la membrana que se habían propuesto por aquel entonces:

A. Modelo de Davson-Danielli-Robertson. Este era el modelo que contaba con mayor aceptación en 1971 cuando se publicó la revisión de Singer. En este modelo, los fosfolípidos se distribuyen en una bicapa. Las proteínas se encuentran en ambas superficies de la bicapa, unidas a ella mediante interacciones iónicas entre los grupos de cabeza cargados de los fosfolípidos y grupos cargados de las proteínas. Muy importante: no se encuentran proteínas en el interior de la bicapa.

B. Modelo de la subunidad de lipoproteína de Benson. Aquí, las proteínas son globulares y la membrana es una mezcla lípido-proteína. Las colas hidrofóbicas de los lípidos están incrustadas en las partes hidrofóbicas de las proteínas. Los grupos de cabeza de los lípidos están expuestos al disolvente. No existe una bicapa lipídica.



C. Modelo del mosaico lípido-proteína globular. Este modelo se muestra en la Figura 11–3. Los lípidos forman una bicapa y las proteínas están incrustadas en ella. Algunas proteínas se extienden a través de la bicapa mientras que otras no. Las proteínas están ancladas en la bicapa mediante interacciones hidrofóbicas entre las colas hidrofóbicas de los lípidos y las porciones hidrofóbicas de la proteína.

Para los datos que se dan a continuación, considere de qué modo cada fragmento de información se alinea con cada uno de los tres modelos de estructura de la membrana. ¿Qué modelo(s) está sostenido, cuál no lo está y qué reservas tiene acerca de los datos o su interpretación? Explique su razonamiento.

(a) Cuando se fijaron las células, se tiñeron con tetróxido de osmio y se examinaron al microscopio electrónico, dieron

imágenes tales como las de la Figura 11–1: las membranas mostraron una apariencia de "vía de tren", con dos líneas oscuras separadas por un espacio claro.

(b) Se encontró que el grosor de las membranas en células fijadas y teñidas de la misma manera era de 5 a 9 nm. El grosor de una bicapa de fosfolípido "desnuda", sin proteínas, fue de 4 a 4,5 nm. El grosor de una monocapa sencilla de proteínas es de alrededor de 1 nm.

(c) En palabras de Singer: "La composición de aminoácidos promedio de las proteínas de membrana no se puede distinguir de la de las proteínas solubles. En particular, una fracción sustancial de los residuos son hidrofóbicos" (p. 165).

(d) Tal como se describió en los Problemas 1 y 2 de este capítulo, los investigadores han extraído membranas de las células, extraído los lípidos y comparado el área de la monocapa lipídica con el área de la membrana celular original. La interpretación de los resultados se complicó a causa de la cuestión ilustrada en el Problema 1: el área de la monocapa dependía de lo fuerte que se la empujaba. Con presiones muy suaves, la razón entre el área de la monocapa y el área de la membrana era de aproximadamente 2,0. A presiones más elevadas (que se cree se parecen más a las que se encuentran en las células) la razón fue sustancialmente menor.

(e) La espectroscopia de dicroísmo circular utiliza cambios en la polarización de la luz UV para obtener datos acerca de la estructura secundaria de las proteínas (véase la Fig. 4–9). En promedio, esta técnica mostró que las proteínas de membrana tienen una gran cantidad de hélice α y poco o nada de hoja β. Este hallazgo estaba de acuerdo con que la mayor parte de las proteínas de membrana tenían una estructura globular.

(f) La fosfolipasa C es un enzima que elimina los grupos de cabeza polares (incluido el fosfato) de los fosfolípidos. En varios estudios, el tratamiento de membranas intactas con fosfolipasa C eliminó alrededor del 70% de los grupos de cabeza sin destruir la estructura en forma de "vía de tren" de las membranas.

(g) Singer describió un estudio en el que "una glucoproteína de masa molecular aproximada de 31.000 en las membranas celulares de los glóbulos rojos humanos se cortaba mediante tratamiento tríptico de las membranas dando glucopéptidos solubles de unos 10.000 de masa molecular, mientras que las porciones restantes eran muy hidrofóbicas" (p. 199). El tratamiento con tripsina no produjo grandes cambios en las membranas las cuales permanecieron intactas.

La revisión de Singer también incluía otros muchos estudios en esta área. Al final, sin embargo, los datos disponibles en 1971 no probaron de forma conclusiva que el modelo C era correcto. A medida que se han acumulado más datos, este modelo de estructura de la membrana ha sido aceptado por la comunidad científica.

Referencia

Singer, S.J. (1971) The molecular organization of biological membranes. In *Structure and Function of Biological Membranes* (Rothfield, L.I., ed.), pp. 145–222, Academic Press, Inc., New York.

> Cuando entré por primera vez en el estudio de la acción hormonal, hace unos 25 años, había un amplio sentimiento entre los biólogos de que la acción hormonal no se podía estudiar de una manera significativa en ausencia de una estructura celular organizada. Sin embargo, al reflexionar sobre la historia de la bioquímica, me pareció que existía una posibilidad real de que las hormonas pudieran actuar a nivel molecular.
>
> —*Earl W. Sutherland, Conferencia Nobel, 1971*

12

Bioseñalización

La capacidad de las células para recibir y actuar en respuesta a señales que provienen de más allá de la membrana plasmática es fundamental para la vida. Las células bacterianas reciben información constante de proteínas de la membrana que actúan como receptores de información y analizan del medio que les rodea el pH, la fuerza osmótica, la disponibilidad de alimento, oxígeno y luz, y la presencia de sustancias nocivas, depredadores o competidores para el alimento. Estas señales provocan respuestas apropiadas, tales como el movimiento hacia el alimento o el alejamiento de sustancias toxicas o la formación de esporas latentes en un medio carente de nutrientes. En organismos pluricelulares, células con diferentes funciones intercambian una amplia variedad de señales. Las células vegetales responden a hormonas de crecimiento y a variaciones de la luz solar. Las células animales intercambian información sobre las concentraciones de iones y glucosa en los fluidos extracelulares y las actividades metabólicas interdependientes que tienen lugar en diferentes tejidos y, en un embrión, la localización correcta de las células durante su desarrollo. En todos estos casos, la señal representa *información* que es detectada por receptores específicos y se convierte en una respuesta celular en la que siempre interviene un proceso *químico*. Esta conversión de información en cambio químico, **transducción de señal,** es una propiedad universal de las células vivas.

12.1 Características generales de la transducción de señales

Las transducciones de señal son extraordinariamente específicas y refinadamente sensibles. La **especificidad** se consigue por complementariedad molecular precisa entre las moléculas señal y receptor **(Fig. 12–1a),** en la que intervienen el mismo tipo de fuerzas débiles (no covalentes) que tienen lugar en las interacciones enzima-sustrato y antígeno-anticuerpo. Los organismos multicelulares tienen un nivel de especificidad adicional, ya que los receptores para una señal determinada, o las dianas intracelulares de una determinada vía de señal, sólo están presentes en ciertos tipos de células. La hormona liberadora de tirotropina, por ejemplo, desencadena respuestas en las células de la hipófisis anterior pero no en hepatocitos, que carecen de receptores para esta hormona. La adrenalina altera el metabolismo del glucógeno en los hepatocitos pero no en los adipocitos; en este caso ambos tipos celulares tienen receptores para esta hormona, pero, mientras que los hepatocitos poseen glucógeno y el enzima metabolizador de glucógeno que se estimula por adrenalina, los eritrocitos no contienen ni el uno ni el otro.

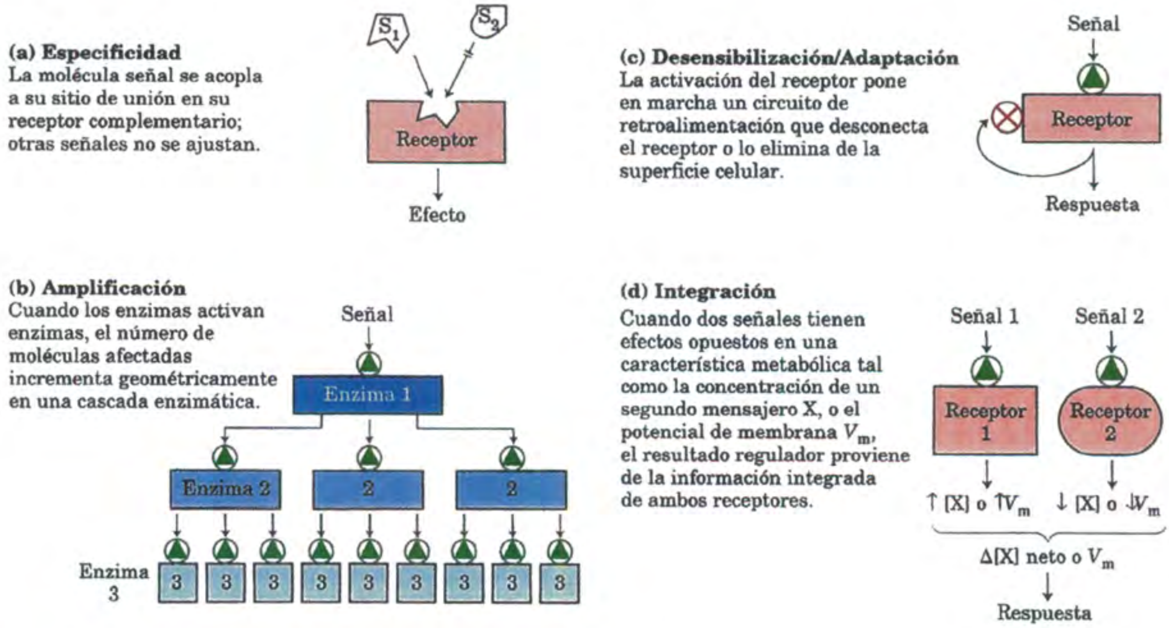


FIGURA 12–1 Cuatro características de los sistemas de transducción de señal.

Tres factores explican la extraordinaria sensibilidad de los transductores de señal: la elevada afinidad de los receptores para las moléculas señal, la cooperatividad (a menudo pero no siempre) en la interacción entre el ligando y el receptor, y la amplificación de la señal por cascadas enzimáticas. La **afinidad** entre la señal (ligando) y el receptor puede expresarse como la constante de disociación K_d, a menudo 10^{-10} M o menos, lo que quiere decir que el receptor puede detectar concentraciones picomolares de una molécula señal. Las interacciones entre el ligando y el receptor pueden ser cuantificadas por el análisis de Scatchard que proporciona una medida cuantitativa de la afinidad (K_d) y el número de sitios de unión a ligando en una muestra de receptor (Recuadro 12–1).

La **cooperatividad** en las interacciones entre el ligando y el receptor acarrean grandes cambios en la activación del receptor con pequeños cambios en la concentración de ligando (recuerde el efecto de cooperatividad en la unión de oxígeno a la hemoglobina; véase la Fig. 5–12). La **amplificación** por **cascadas enzimáticas** tiene lugar cuando un enzima asociado con un receptor de señal se activa y, a su vez, cataliza la activación de muchas moléculas de un segundo enzima, cada una de las cuales activa muchas moléculas de un tercero, y así sucesivamente (Fig. 12–1b). Estas cascadas dan lugar a amplificaciones de varios órdenes de magnitud en milisegundos. La respuesta a una señal también debe terminarse de modo que los efectos a lo largo de la ruta son proporcionales a la fuerza del estímulo original.

La sensibilidad de los sistemas receptores está sujeta a modificación. Cuando una señal está presente de forma continua, se produce una **desensibilización** del sistema receptor (Fig. 12–1c); cuando el estímulo disminuye por debajo de un determinado umbral, el sistema se vuelve sensible de nuevo. Piense en lo que sucede a su sistema de transducción visual cuando pasa desde un sitio iluminado con luz del sol brillante a una habitación oscura o desde la oscuridad a la luz.

Una última característica notable de los sistemas de transducción de señal es la **integración** (Fig. 12–1d), la capacidad del sistema para recibir múltiples señales y produ puesta unificada apropiada a las necesidades de la organismo. Diferentes vías de señalización conversan las unas con las otras a diferentes niveles, originando una abundancia de interacciones que mantienen la homeóstasis en la célula y el organismo.

Una de las revelaciones de la investigación sobre la señalización es la notable conservación de los mecanismos de señalización durante la evolución. A pesar de que el número de señales biológicas es grande (Tabla 12–1), probablemente millares, y que la variedad de respuestas a dichas señales es comparablemente numerosa, la maquinaria para translucir todas estas señales se construye a partir de 10 tipos básicos de proteínas.

En este capítulo examinamos algunos ejemplos de las principales clases de mecanismos de señalización y veremos cómo son integrados en funciones biológicas específicas tales como la transmisión de señales nerviosas; respuestas a hormonas y factores de crecimiento; los sentidos de la vista, el olfato y el gusto, y el control del ciclo celular. A menudo, el resultado final de una vía de señalización es la fosforilación de unas pocas proteínas diana específicas, lo que modifica sus actividades alterando así pues las actividades de la célula. A lo largo de nuestra exposi-

TABLA 12–1 Algunas señales a las que responden las células

Antígenos	Hormonas
Componentes de la matriz extracelular	Luz
	Neurotransmisores
Contacto mecánico	Nutrientes
Factores de crecimiento	Saborizantes
Feromonas	Señales del desarrollo
Glucoproteínas de la superficie celular/oligosacáridos	Sustancias olorosas

RECUADRO 12-1 MÉTODOS El análisis de Scatchard cuantifica la interacción receptor-ligando

Las acciones celulares de una hormona empiezan cuando la hormona (ligando, L) se une específica y fuertemente a su receptor proteico (R) o en su célula diana. La unión está producida por interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electroestáticas) entre las superficies complementarias del ligando y del receptor. La interacción receptor-ligando produce un cambio de conformación que altera la actividad biológica del receptor, el cual puede ser un enzima, un enzima regulador, un canal iónico o un regulador de la expresión génica.

La unión receptor-ligando está descrita por la ecuación

$$\underset{\text{Receptor}}{R} + \underset{\text{Ligando}}{L} \rightleftharpoons \underset{\text{Complejo receptor-ligando}}{RL}$$

Esta unión, como la de un enzima a su sustrato, depende de las concentraciones de los componentes que interaccionan y puede ser descrita por una constante de equilibrio:

$$\underset{\text{Receptor}}{R} + \underset{\text{Ligando}}{L} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{Complejo receptor-ligando}}{RL}$$

$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = 1/K_d$$

donde K_a es la constante de asociación y K_d es la constante de disociación.

Como en el caso de la unión enzima-sustrato, la unión receptor-ligando es saturable. Cuanto más ligando se añade a una cantidad fija de receptor, una fracción creciente de moléculas de receptor es ocupada por ligando (Fig. 1a). Una medida bastante aproximada de la afinidad receptor-ligando viene dada por la concentración de ligando necesaria para obtener la semisaturación del receptor. El **análisis de Scatchard** de la unión receptor-ligando permite el cálculo tanto de la constante de disociación K_d como del número de sitios de unión al receptor en una preparación determinada. Cuando la unión ha alcanzado el equilibrio, el número total de sitios de unión posibles, B_{max}, es igual al número de sitios no ocupados, representado por [R], más el número de sitios ocupados o unidos a ligando, [RL]. Es decir, $B_{max} = [R] + [RL]$. El número de sitios no ligados puede expresarse en función del número total de sitios menos los sitios ocupados: $[R] = B_{max} - [RL]$. La expresión de equilibrio puede escribirse ahora:

$$K_a = \frac{[RL]}{[L](B_{max} - [RL])}$$

Reordenándola para obtener la proporción entre ligando unido a receptor y ligando libre (no unido), tenemos

$$\frac{[\text{Unido}]}{[\text{Libre}]} = \frac{[RL]}{[L]} = K_a(B_{max} - [RL])$$
$$= \frac{1}{K_d}(B_{max} - [RL])$$

Esta forma de intersección-pendiente de la ecuación muestra que una gráfica de [ligando unido]/[ligando libre] frente a [ligando unido] debería dar una línea recta con una pendiente de $-K_a$ (o $-1/K_d$) y una intersección con la abscisa de B_{max}, el número total de sitios de unión (Fig. 1b). Las interacciones hormona-ligando tienen típicamente valores de K_d entre 10^{-9} y 10^{-11} M, correspondiente a una unión muy fuerte.

El análisis de Scatchard es seguro para casos simples pero como muestra la gráfica de Lineweaver-Burk para enzimas, cuando el receptor es una proteína alostérica, la gráfica se desvía de la linealidad.

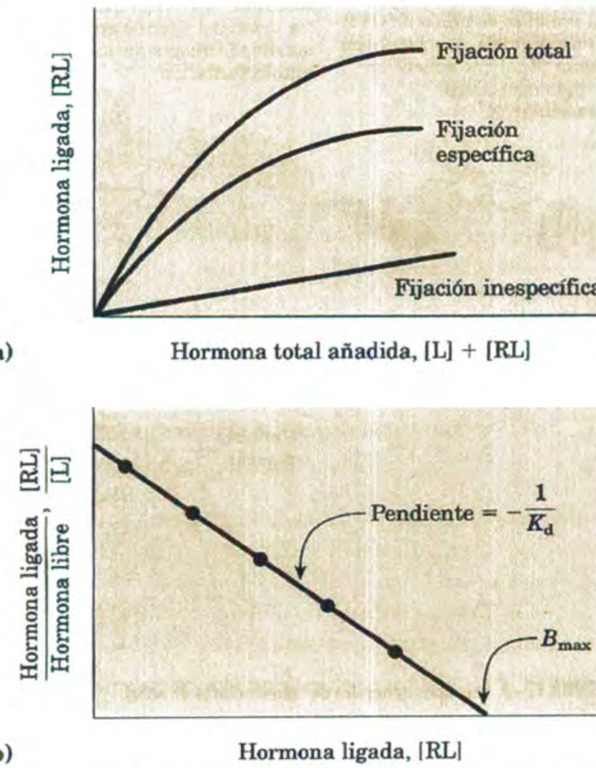


FIGURA 1 Análisis de Scatchard de una interacción receptor-ligando. Se añaden concentraciones diferentes de un ligando (L), una hormona por ejemplo, marcado radiactivamente a una cantidad fija de receptor (R) y se determina la fracción de hormona fijada al receptor separando el complejo receptor-hormona (RL) de la hormona libre.

(a) Una gráfica de [RL] frente a [L] + [RL] (la hormona total añadida) es hiperbólica, aumentando hacia un máximo de [RL] a medida que se saturan los sitios de receptor. Para controlar la presencia de sitios no saturables inespecíficos (por ejemplo, las hormonas icosanoides se unen de manera inespecífica a la bicapa lipídica) es también necesaria una serie separada de experimentos de unión. Se añade un gran exceso de hormona no marcada junto con la solución diluida de la hormona marcada. Las moléculas sin marcar compiten con las marcadas para unirse específicamente al sitio saturable del receptor, pero no para la fijación inespecífica. Se obtiene el verdadero valor de la fijación específica restando la fijación inespecífica de la fijación total.

(b) Una gráfica lineal de [RL]/[L] frente a [RL] da K_d y B_{max} del complejo receptor-hormona. Compare estas gráficas con las de V_0 frente a [S] y $1/V_0$ frente a 1/[S] de un complejo enzima-sustrato (véase la Fig. 6–12, Recuadro 6–1).

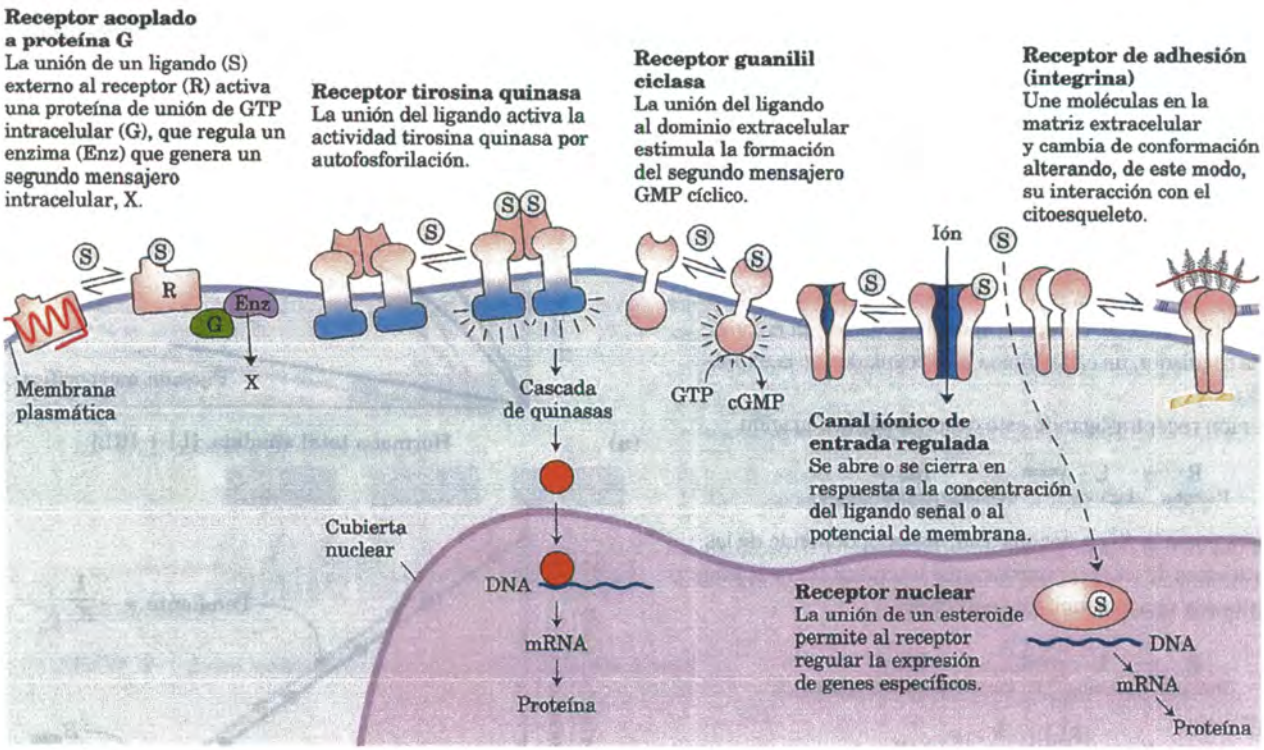


FIGURA 12–2 Seis tipos generales de transductores de señal.

ción pondremos énfasis en la conservación de mecanismos fundamentales para la transducción de señales biológicas y la adaptación de estos mecanismos básicos a una gran variedad de vías de señalización.

Consideraremos aquí los detalles moleculares de diversos sistemas de transducción de señal representativos, clasificados según el tipo de receptor. El desencadenante para cada sistema es diferente pero las características generales de la transducción de señal son comunes para todos: una señal interacciona con un receptor; el receptor activado interacciona con la maquinaria celular produciendo una segunda señal o un cambio en la actividad de una proteína celular; la actividad metabólica de la célula diana experimenta un cambio; finalmente, el fenómeno de transducción se acaba. Para ilustrar estas características generales de los sistemas de señalización, aportamos ejemplos de cada uno de los seis mecanismos básicos de señalización **(Fig. 12–2)**.

1. *Receptores acoplados a proteína G* que activan *indirectamente* (a través de proteínas que unen GTP, o proteínas G) enzimas que producen segundos mensajeros intracelulares. Este tipo de receptor se ilustra con el sistema receptor β-adrenérgico que detecta adrenalina (epinefrina) (Sección 12.2).
2. *Receptores tirosina quinasas*, receptores de la membrana plasmática que son también enzimas. Cuando se activa uno de esos receptores por su ligando extracelular, cataliza la fosforilación de varias proteínas citosólicas o de la membrana plasmática. Un ejemplo lo constituye el receptor de insulina (Sección 12.3); el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) es otro.
3. *Receptores guanilil ciclasas*, que también son receptores de la membrana plasmática con un dominio citoplasmático enzimático. El segundo mensajero intracelular de estos receptores, guanosina monofosfato cíclico (cGMP), activa una proteína quinasa citosólica que fosforila proteínas celulares con lo que cambian sus actividades Sección 12.4).
4. *Los canales iónicos de compuerta* de la membrana plasmática que se abren y se cierran (de ahí el término compuerta) en respuesta a la unión de ligandos químicos o cambios en el potencial transmembrana. Éstos son los transductores de señal más sencillos. El canal iónico del receptor de acetilcolina es un ejemplo de este mecanismo (Sección 12.6).
5. *Los receptores de adhesión* que interaccionan con componentes macromoleculares de la matriz extracelular (tal como el colágeno) y llevan al sistema citoesquelético instrucciones sobre migración celular o adherencia a la matriz. Las integrinas ilustran este tipo general de mecanismo de transducción (Sección 12.7).
6. *Receptores nucleares* (receptores de esteroides) que cuando se unen a su ligando específico (tal como la hormona estrógena) alteran la velocidad a la que genes específicos son transcritos y traducidos en proteínas celulares. Debido a que las hormonas esteroides funcionan a través de mecanismos íntimamente relacionados con la regulación de la expresión génica, los consideramos aquí sólo brevemente (Sección 12.8) y aplazamos una discusión detallada de su acción hasta el Capítulo 28.

Al empezar esta discusión de la señalización biológica, no está de más unas palabras sobre la nomenclatura de las proteínas de señalización. Estas proteínas se descubren normalmente dentro de un contexto y se nombran de acuerdo con el mismo;

después se ve que intervienen en una gama más amplia de funciones biológicas para las que el nombre original no es de gran ayuda. Por ejemplo, la proteína del retinoblastoma, pRb, se identificó inicialmente como el sitio de una mutación que contribuye al cáncer de retina (retinoblastoma), pero se sabe ahora que funciona en muchas vías esenciales para la división celular en todas las células, no sólo en las de la retina. Algunos genes y proteínas reciben nombres neutros: la proteína supresora de tumores p53, por ejemplo, es una *proteína* de *53* kDa, pero su nombre no da ninguna pista sobre su gran importancia en la regulación de la división celular y en el desarrollo del cáncer. En este capítulo definimos generalmente estos nombre de proteínas a medida que los encontramos, introduciendo los nombre usados normalmente por los investigadores en cada campo. ¡No se desanime si no puede asimilarlos todos de golpe la primera vez que los encuentre!

RESUMEN 12.1 Características generales de la transducción de señal

- Todas las células tienen mecanismos de transducción de señales altamente sensibles y específicos, conservados durante la evolución.
- Una amplia variedad de estímulos, actúan a través de proteínas receptoras específicas en la membrana plasmática.
- Los receptores unen la molécula señal, amplifican la señal, la integran con la señal de entrada de otros receptores y transmiten la información al interior de la célula. Si la señal persiste, la desensibilización del receptor reduce o termina la respuesta.
- Los organismos multicelulares tienen seis tipos generales de mecanismos de señalización: proteínas de membrana que actúan a través de proteínas G; receptores tirosina quinasas; receptores guanilil ciclasas que actúan a través de una proteína quinasa; canales iónicos de compuerta; receptores de adhesión que son portadores de información entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, y receptores nucleares que unen esteroides y alteran la expresión génica.

12.2 Receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros

La transducción de señal, a través de **receptores acoplados a proteína G (GPCR)** está definido por tres componentes esenciales: un receptor de membrana plasmática con siete segmentos helicoidales transmembrana, un enzima efector en la membrana plasmática que genera un **segundo mensajero** intracelular y una **proteína fijadora de un nucleótido de guanosina (proteína G)** que activa el enzima efector. La proteína G estimulada por el receptor activado, intercambia el GDP unido por GTP; el complejo GTP-proteína se disocia del receptor ocupado y se une a un enzima próximo, alterando su actividad. El genoma humano codifica unos 350 GPCR para detectar hormonas, factores de crecimiento y otros ligandos endógenos y unos 500 que sirven como receptores del olfato y del gusto.

Se ha implicado a los GPCR en muchas enfermades humanas comunes, entre ellas alergias, depresión, ceguera, diabetes y diversos defectos cardiovasculares con serias consecuencias para la salud. Casi la mitad de *todos* los medicamentos del mercado tienen como objetivo un GPCR u otro. Por ejemplo, el receptor β-adrenérgico, que interviene en los efectos de la adrenalina, es la diana de los beta bloqueadores prescritos para diversas enfermedades tales como la hipertensión, la arritmia cardiaca, la ansiedad y la migraña. Al menos 150 de los GPCR que se encuentran en el genoma humano son aún "receptores huérfanos": no se han identificado todavía sus ligandos naturales, por lo que no sabemos nada acerca de su biología. El receptor β-adrenérgico, con su biología y farmacología bien conocidas es el prototipo de todos los GPCR por lo que nuestro análisis de los sistemas de transducción de señal empieza aquí. ■

El sistema receptor β-adrenérgico actúa a través del segundo mensajero cAMP

La adrenalina hace sonar la alarma cuando alguna amenaza requiere que el organismo movilice su maquinaria de producción de energía; señala la necesidad de luchar o huir. La acción de la adrenalina empieza cuando la hormona se une a un receptor proteico en la membrana plasmática de una célula sensible a la hormona. Los **receptores adrenérgicos** son de cuatro tipos generales, α_1, α_2, β_1 y β_2, definidos por diferencias en sus afinidades y respuestas a un grupo de agonistas y antagonistas. Los **agonistas** son análogos estructurales que se unen a un receptor e imitan los efectos de su ligando natural; los **antagonistas** son análogos que se unen sin provocar el efecto normal y bloquean los efectos de los agonistas, ligando biológico incluido. A veces, la afinidad del agonista sintético o del antagonista hacia el receptor es mayor que la del agonista natural (**Fig. 12–3**). Los cuatro tipos de receptores adrenérgicos se

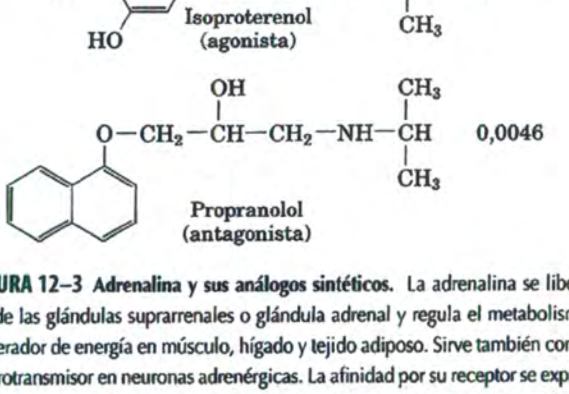


FIGURA 12–3 Adrenalina y sus análogos sintéticos. La adrenalina se libera desde las glándulas suprarrenales o glándula adrenal y regula el metabolismo generador de energía en músculo, hígado y tejido adiposo. Sirve también como neurotransmisor en neuronas adrenérgicas. La afinidad por su receptor se expresa en forma de una constante de disociación del complejo receptor-ligando. El isoproterenol y el propranolol son análogos sintéticos, uno de ellos agonista con una afinidad por el receptor superior a la de la adrenalina y el otro un antagonista con una afinidad extremadamente elevada.

encuentran en diferentes tejidos diana y dan lugar a respuestas diferentes frente a la adrenalina. Aquí nos centramos en los **receptores β-adrenérgicos** de músculo, hígado y tejido adiposo. Estos receptores provocan cambios en el metabolismo energético, tal como se describe en el Capítulo 23, incluidos el incremento en la degradación del glucógeno y de las grasas. Los receptores adrenérgicos de los subtipos β_1 y β_2 actúan a través del mismo mecanismo, por lo que en nuestra discusión, "β-adrenérgico" se refiere a los dos tipos.

El receptor β-adrenérgico es una proteína integral con siete regiones hidrofóbicas de 20 a 28 residuos aminoácidos que "serpentean" de un lado a otro de la membrana plasmática siete veces (de ahí los nombres alternativos para los GPCR: **receptores serpentina** o **receptores heptahelicoidales**). La unión de adrenalina a un sitio del receptor en la profundidad de la membrana (**Fig. 12–14a**, etapa ①) promueve un cambio de conformación en el dominio intracelular del receptor que afecta su interacción con la segunda proteína en la vía de transducción de señal, una **proteína G estimuladora,** o **G_s,** en la cara citosólica de la membrana plasmática. Alfred F. Gilman y Martin Rodbell descubrieron que la G_s activa estimula la producción de cAMP (AMP cíclico) por la adenilil ciclasa (véase más adelante) en la membrana plasmática. La G_s, prototipo de una familia de proteínas G que actúan en la bioseñalización (véase el Recuadro 12-2) es heterotrimérica, con estrucura de subunidades $\alpha\beta\gamma$. Cuando el sitio de unión a nucleótido de G_s (en la subunidad α) está ocupado por GTP, G_s es activa y puede activar la adenilil ciclasa (AC en la Fig. 12-4a); con GDP unido al sitio, G_s es inactiva. El receptor β-adrenérgico activado interacciona con G_s catalizando el desplazamiento de GDP unido por GTP y convirtiendo G_s a su forma activa (paso ②). Cuando sucede, las subunidades β y γ de G_s se disocian de la α en forma de dímero $\beta\gamma$ y $G_{s\alpha}$, con su GTP unido, se desplaza en el plano de la membrana desde el receptor a una molécula cercana de adenilil ciclasa (paso ③). $G_{s\alpha}$ se mantiene unido a la membrana por un grupo palmitilo unido covalentemente (véase la Fig. 11-14).

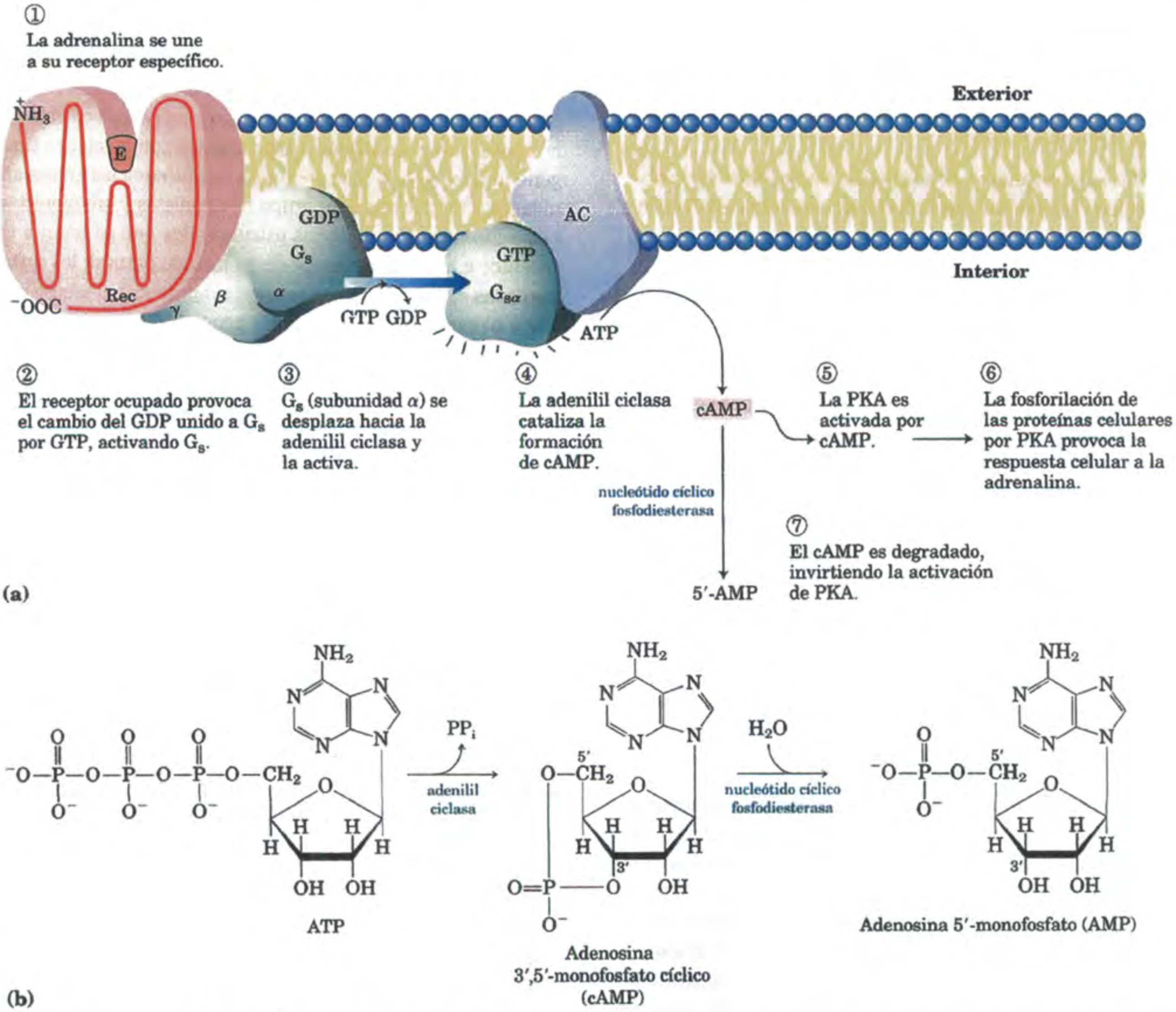


FIGURA 12–4 Transducción de la señal de la adrenalina: la vía β-adrenérgica. **(a)** El mecanismo que acopla la unión de la adrenalina (E) a su receptor (Rec) con activación de la adenilil ciclasa (AC); las siete etapas se discuten más ampliamente en el texto. La misma molécula de adenilil ciclasa en la membrana plasmática puede ser regulada por una proteína G estimuladora (G_s), tal como se muestra, o por una proteína G inhibidora (G_i, no mostrada). G_s y G_i están bajo la influencia de diferentes hormonas. Las hormonas que inducen la unión de GTP a G_i provocan la *inhibición* de la adenilil ciclasa, dando como resultado una baja [cAMP] celular. **(b)** La acción combinada de los enzimas que catalizan los pasos ④ y ⑦, forman y luego destruyen el segundo mensajero, cAMP.

RECUADRO 12-2 MEDICINA Proteínas G: interruptores binarios en salud y enfermedad

Alfred G. Gilman y Martin Rodbell (Fig. 1) descubrieron los papeles cruciales de las proteínas de unión de nucleótidos de guanosina (proteínas G) en un gran número de procesos celulares, entre los que se cuentan la percepción sensorial, la señalización para la división celular, el crecimiento y la diferenciación, los movimientos intracelulares de proteínas y vesículas membranosas y la síntesis de proteínas. El genoma humano codifica casi 200 de estas proteínas, las cuales difieren en tamaño y estructura de subunidades, localización intracelular y función. No obstante, todas las proteínas G comparten una característica común: pueden ser activadas y a continuación, después de un breve período, se autoinactivan, sirviendo de este mod como interruptores binarios con temporizadores incorporados. Esta superfamilia de proteínas incluye las proteínas G triméricas que intervienen en la señalización adrenérgica (G_s y G_i) y en la visión (transducina); pequeñas proteínas G tales como las que intervienen en la señalización de la insulina (Ras) y otras que funcionan en el tránsito de vesículas (ARF y Rab), transporte al interior del núcleo y salida del mismo (Ran; véase la Fig. 27–42) y coordinación del ciclo celular (Rho), además de diversas proteínas que intervienen en la síntesis de proteínas (factor de inicio IF2 y factores de elongación EF-Tu y EF-G; véase el Capítulo 26). Muchas proteínas G tienen lípidos unidos covalentemente, lo que les confiere afinidad por las membranas y dictan su localización en la célula.

Todas las proteínas G tienen la misma estructura núcleo y utilizan el mismo mecanismo para pasar de una conformación inactiva, favorecida cuando está unido GDP, y una conformación activa, favorecida por la unión de GTP. Podemos utilizar la proteína Ras (~20 kDa), unidad mínima de señalización, como prototipo de todos los miembros de esta superfamilia (Fig. 2).

En la conformación con GTP unido, la proteína G expone regiones previamente sepultadas (denominadas **interruptor I** e **interruptor II**) que interaccionan con proteínas que intervienen posteriormente en la ruta de señalización, hasta que la proteína G se autoinactiva al hidrolizar su GTP unido a GDP. El determinante clave de la conformación de la proteína G es el fosfato γ del GTP, que interacciona con una región denominada

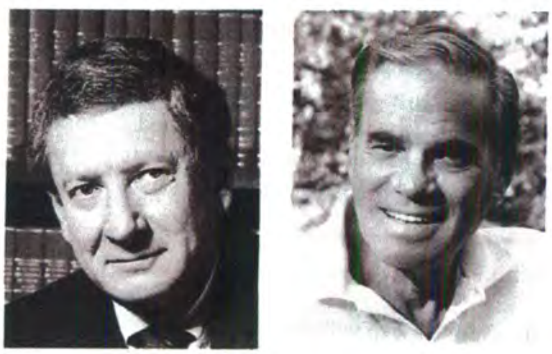


FIGURA 1 Alfred G. Gilman (izquierda) y Martin Rodbell (1925-1998; derecha). Sus conferencias de recepción del Premio Nobel sobre el descubrimiento y exploración de las proteínas G pueden obtenerse en www.nobelprize.org.

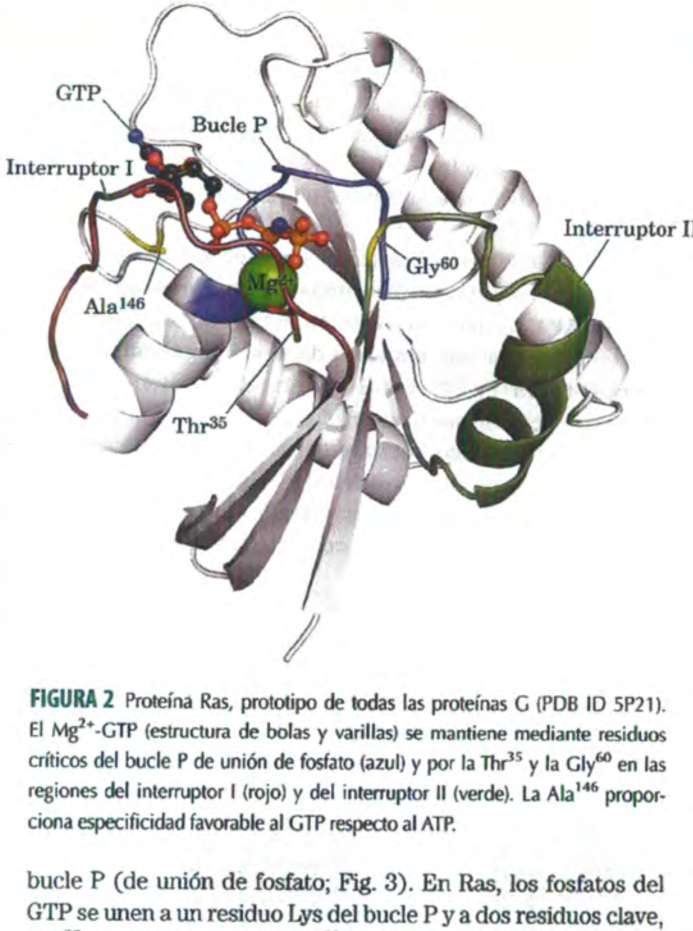


FIGURA 2 Proteína Ras, prototipo de todas las proteínas G (PDB ID 5P21). El Mg^{2+}-GTP (estructura de bolas y varillas) se mantiene mediante residuos críticos del bucle P de unión de fosfato (azul) y por la Thr^{35} y la Gly^{60} en las regiones del interruptor I (rojo) y del interruptor II (verde). La Ala^{146} proporciona especificidad favorable al GTP respecto al ATP.

bucle P (de unión de fosfato; Fig. 3). En Ras, los fosfatos del GTP se unen a un residuo Lys del bucle P y a dos residuos clave, Thr^{35} en el interruptor I y Gly^{60} en el interruptor II, que se unen por enlace de hidrógeno a los oxígenos del fosfato γ del GTP. Estos enlaces de hidrógeno actúan como un par de muelles que

(*continúa en la página siguiente*)

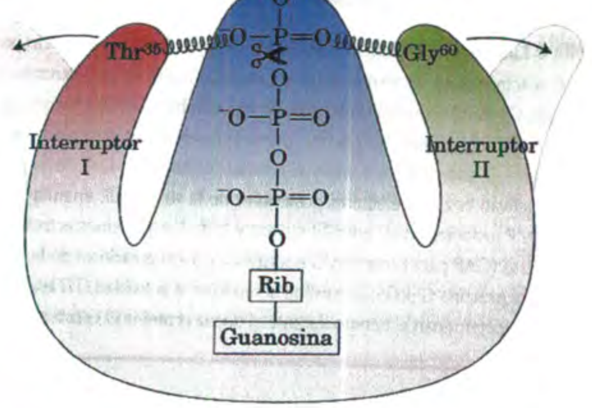


FIGURA 3 Cuando se hidroliza el GTP unido, por las actividades GTPasa y sus GAP, la pérdida de los enlaces de hidrógeno con Thr^{35} y Gly^{60} permite que las regiones de los interruptores I y II se relajen adoptando una conformación en las que ya no están disponibles para interaccionar con dianas posteriores tales como Raf.

RECUADRO 12-2 MEDICINA Proteínas G: interruptores binarios en salud y enfermedad *(continuación de la página anterior)*

mantienen la proteína en su conformación activa. Cuando se corta el GTP a GDP y se libera P_i, se pierden estos puentes de hidrógeno; la proteína se relaja a su conformación inactiva, sepultando los sitios que interaccionan con otras moléculas asociadas en su estado activo. Ala^{146} se une por enlace de hidrógeno con el oxígeno de la guanina permitiendo que se una el GTP pero no el GDP.

La actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G se incrementa hasta 10^5 veces por **proteínas activadoras de la GTPasa (GAP)**, también llamadas, en el caso de las proteínas G heterotriméricas, **reguladores de la señalización por proteína G (RGS**; Fig. 4). Las GAP (y los RGS) determinan así cuánto tiempo permanece "abierto" el interruptor. Estas moléculas aportan un residuo Arg clave que alcanza el sitio activo de la GTPasa presente en la proteína G, donde contribuye a la catálisis. El proceso intrínsecamente lento de reemplazar el GDP unido por GTP, que activa la proteína, está catalizado por **factores de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF)** asociados con la proteína G (Fig. 4).

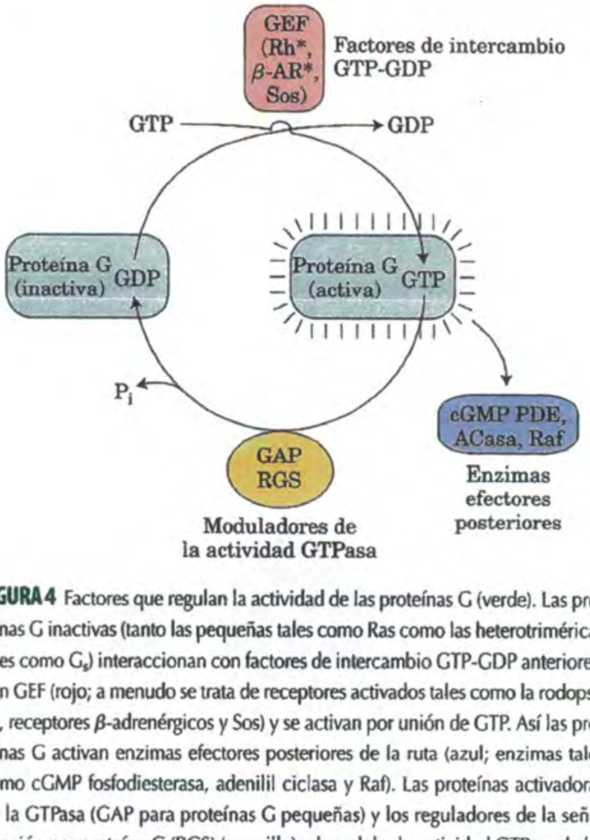


FIGURA 4 Factores que regulan la actividad de las proteínas G (verde). Las proteínas G inactivas (tanto las pequeñas tales como Ras como las heterotriméricas tales como G_s) interaccionan con factores de intercambio GTP-GDP anteriores, con GEF (rojo; a menudo se trata de receptores activados tales como la rodopsina, receptores β-adrenérgicos y Sos) y se activan por unión de GTP. Así las proteínas G activan enzimas efectores posteriores de la ruta (azul; enzimas tales como cGMP fosfodiesterasa, adenilil ciclasa y Raf). Las proteínas activadoras de la GTPasa (GAP para proteínas G pequeñas) y los reguladores de la señalización por proteína G (RGS) (amarillo), al modular la actividad GTPasa de las proteínas G, determinan el tiempo durante el que la proteína G estará activa.

Debido a que las proteínas G tienen papeles cruciales en tantos procesos de señalización, no es sorprendente que las proteínas G defectuosas produzcan diversas enfermedades. Alrededor del 25% de todos los cánceres humanos (y en una proporción mucho mayor en ciertos tipos de cáncer) presentan una mutación en una proteína Ras (de manera típica en uno de los residuos clave alrededor del sitio de unión de GTP en el bucle P) que elimina virtualmente su actividad GTPasa. Una vez activada por la unión de GTP, esta proteína Ras permanece constitutivamente activa promoviendo la división celular en células que no deberían dividirse. El gen supresor tumoral *NF1* codifica una GAP que incrementa la actividad GTPasa de la Ras normal. Las mutaciones en *NF1* que dan lugar a una GAP no funcional deja Ras con sólo su actividad GTPasa intrínseca; una vez activada por la unión de GTP, Ras permanece activa y continúa enviando la señal: dividirse.

Las proteínas G heterotriméricas defectuosas también pueden ser causa de enfermedad. Las mutaciones en el gen que codifica la subunidad α de G_s (que interviene en los cambios de [cAMP] en respuesta a estímulos hormonales) pueden dar lugar a una G_α que es activa, o inactiva, de manera permanente. Las mutaciones "activadoras" tienen lugar generalmente en residuos clave para la actividad GTPasa; llevan a una concentración de cAMP elevada de forma continuada, con importantes consecuencias en el resto de la vía, entre las que se cuentan una proliferación celular indeseable. Tales mutaciones se encuentran, por ejemplo, en cerca del 40% de tumores de la hipófisis (adenomas). Los individuos con mutaciones "inactivadoras" en G_α no responden a las hormonas (tales como la hormona tiroidea) que actúan a través de cAMP. La mutación en el gen de la subunidad G_α de la transducina (T_α), implicada en la señalización visual, conduce a un tipo de ceguera nocturna, debida aparentemente a una interacción defectuosa entre la subunidad T_α activada y la fosfodiesterasa del segmento exterior del bastón (véase la Fig. 12–38). Una variación en la secuencia del gen que codifica la subunidad β de una proteína G heterotrimérica se encuentra frecuentemente en individuos con hipertensión (presión sanguínea elevada) y se sospecha que la variante de este gen está involucrada en la obesidad y en la aterosclerosis.

Las bacterias patógenas causantes del cólera y la tos ferina producen toxinas cuyas dianas son proteínas G y que interfieren con la señalización normal de las células huésped. La **toxina del cólera,** secretada por *Vibrio cholerae* en el intestino de una persona infectada, es una proteína heterodimérica. La subunidad B

La **adenilil ciclasa** es una proteína integral de la membrana plasmática con su sitio activo en la cara citosólica. La asociación de $G_{s\alpha}$ activa con la adenilil ciclasa estimula a la ciclasa a catalizar la síntesis de cAMP a partir de ATP (Fig. 12-4a, paso ④; véase también la Fig. 12-4b), elevando la [cAMP] citosólica. La interacción entre $G_{s\alpha}$ y la adenilil ciclasa sólo es posible cuando las regiones de "conmutación" de la $G_{s\alpha}$ están expuestas deido a un cambio conformacional inducido por GTP.

Esta estimulación por $G_{s\alpha}$ es autolimitante; $G_{s\alpha}$ *es una GTPasa que se autodesconecta* al convertir su GTP unido en GDP (**Fig. 12–5**). La ahora inactiva $G_{s\alpha}$ se disocia de la adenilil ciclasa, volviendo inactivo al enzima. Después $G_{s\alpha}$ se reasocia

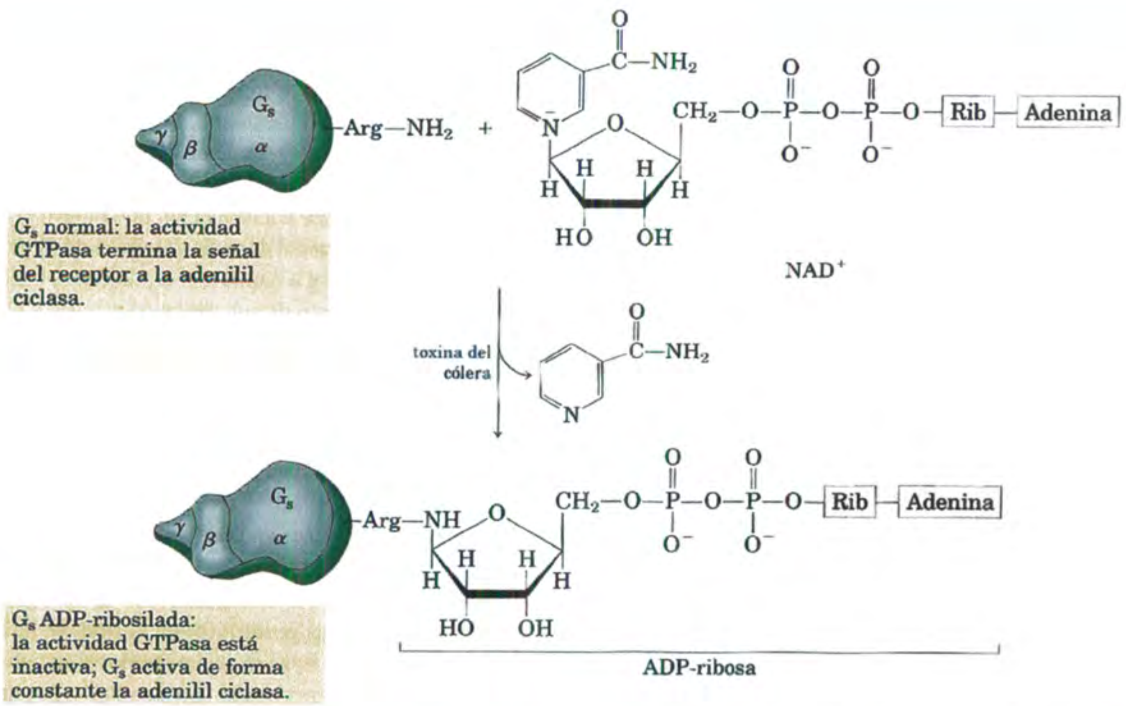


FIGURA 5 Las toxinas bacterianas responsables del cólera y de la tos ferina (pertussis) son enzimas que catalizan la transferencia de la porción ADP-ribosa del NAD^+ a un residuo Arg de G_s (en el caso de la toxina del cólera aquí mostrada) o a un residuo Cys de G_i (toxina pertussis). Las proteínas G así modificadas no responden a los estímulos hormonales normales. La patología de ambas enfermedades es el resultado de una regulación defectuosa de la adenilil ciclasa y una sobreproducción de cAMP.

reconoce gangliósidos específicos de la superficie de las células epiteliales intestinales a los que se une proporcionando una ruta para que la subunidad A entre en estas células. Una vez en el interior la subunidad A se rompe en dos piezas: el fragmento A1 y el fragmento A2. Seguidamente A1 se asocia con el factor de ADP-ribosilación ARF6, una proteína G pequeña, a través de residuos de sus regiones interruptoras I y II, que sólo son accesibles cuando ARF6 está en su forma activa (GTP unido). Esta asociación con ARF6 activa A1, que cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD^+ hasta el residuo Arg crítico del bucle P de la subunidad α de G_s (Fig. 5). La ADP-ribosilación bloquea la actividad GTPasa de G_s por lo que G_s es activa de modo permanente. Esto produce la activación continua de la adenilil ciclasa de las células epiteliales del intestino. La salida de NaCl resultante provoca una salida masiva de agua a través del intestino al responder las células al consiguiente desequilibrio osmótico. Los principales rasgos patológicos del cólera son la deshidratación grave y la pérdida de electrolitos, que en ausencia de una terapia de rehidratación urgente pueden resultar mortales.

La **toxina pertussis** (de la tos ferina), producida por *Bordetella pertussis*, cataliza la ADP-ribosilación de la subunidad α de G_i, que en este caso impide el intercambio GDP-GTP y bloquea la inhibición de la adenilil ciclasa por G_i. La bacteria infecta el tracto respiratorio, en donde destruye las células ciliadas epiteliales que normalmente eliminan el moco. Sin la acción ciliar, se necesita una tos vigorosa para aclarar el tracto; ésta es la tos sofocada característica de la enfermedad que, además, propaga la bacteria a otras personas. No está aún claro de qué modo el defecto en la señalización por proteína G mata las células ciliadas epiteliales.

Dado el gran número de receptores acoplados a proteína G presentes en el genoma humano, parece probable que estudios futuros aportarán otros muchos ejemplos sobre cómo la señalización por proteínas G defectuosas afecta a la salud humana.

con el dímero $\beta\gamma$ ($G_{s\beta\gamma}$), y el G_s inactivo está de nuevo disponible para interaccionar con un receptor unido a hormona. Diversas proteínas G actúan como conmutadores binarios en sistemas de señalización con GPCR y en muchos procesos en los que interviene la fusión o fisión de membranas (Recuadro 12-2).

Proteínas G triméricas: interruptores moleculares

La adrenalina ejerce sus efectos posteriores a través del aumento de la [cAMP] resultante de la activación de la adenilil ciclasa. A su vez, el AMP cíclico activa alostéricamente la **proteína quinasa dependiente de cAMP,** también denominada **proteína quinasa A** o **PKA** (Fig. 12-4a, paso ⑤), que cataliza la fosforilación de otras proteínas, incluida la glucógeno fosfori-

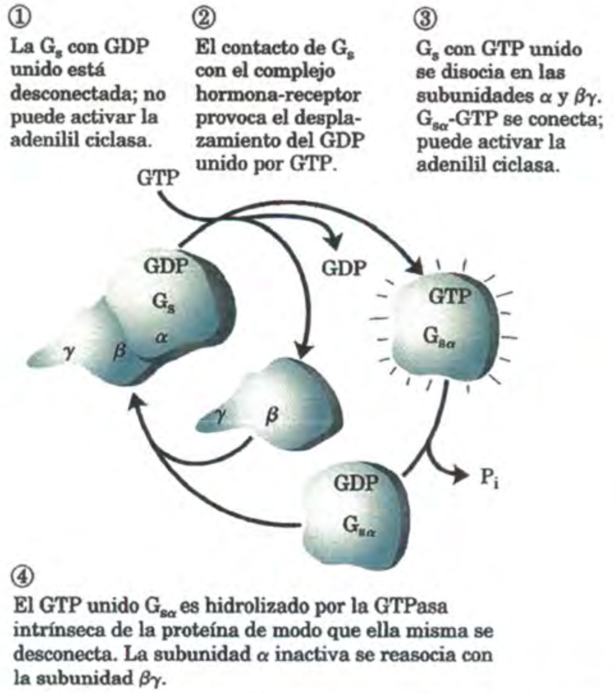


FIGURA 12–5 Autoinactivación de G_s. Las etapas son descritas más detalladamente en el texto. La actividad GTPasa intrínseca de la proteína, en muchos casos estimulada por proteínas RGS (*regulators of G protein signaling*, reguladores de la señalización por la proteína G), determina la rapidez con que el GTP unido es hidrolizado a GDP, y por lo tanto cuánto tiempo permanece activa la proteína G.

lasa *b* quinasa. Este enzima es activo cuando está fosforilado y así puede iniciar el proceso de movilización del glucógeno a partir de las reservas en el músculo y en el hígado en anticipación a las necesidades energéticas.

La forma inactiva de la PKA contiene dos subunidades catalíticas indénticas (C) y dos subunidades reguladoras idénticas (R) **(Fig. 12–6a)**. El complejo tetramérico R_2C_2 es catalíticamente inactivo, debido a que un dominio autoinhibidor de cada subunidad R ocupa el sitio de unión a sustrato de cada subunidad C. Cuando se une cAMP a las subunidades R, éstas experimentan un cambio de conformación que mueve el dominio autoinhibidor de R fuera del dominio catalítico de C, con lo que se disocia el complejo R_2C_2 dando dos subunidades C catalíticamente activas libres. Este mismo mecanismo básico, el desplazamiento de un dominio autoinhibidor, interviene en la activación alostérica de muchos tipos de proteína quinasas por sus segundos mensajeros (tal como se ve en las Figs. 12-14 y 12–22, por ejemplo). La estructura de la hendidura de unión del sustrato de PKA es el prototipo de todas las proteína quinasas conocidas (Fig. 12-6b); ciertos residuos de esta hendidura tienen contrapartes idénticas en la totalidad del más de un millar de proteína quinasas conocidas.

Tal como se indica en la Figura 12-4a (paso ⑥), la PKA regula diversos enzimas posteriores en la ruta de señalización (Tabla 12–2). Aunque estas dianas posteriores tienen diversas funciones, comparten una región con similitud de secuencia al-

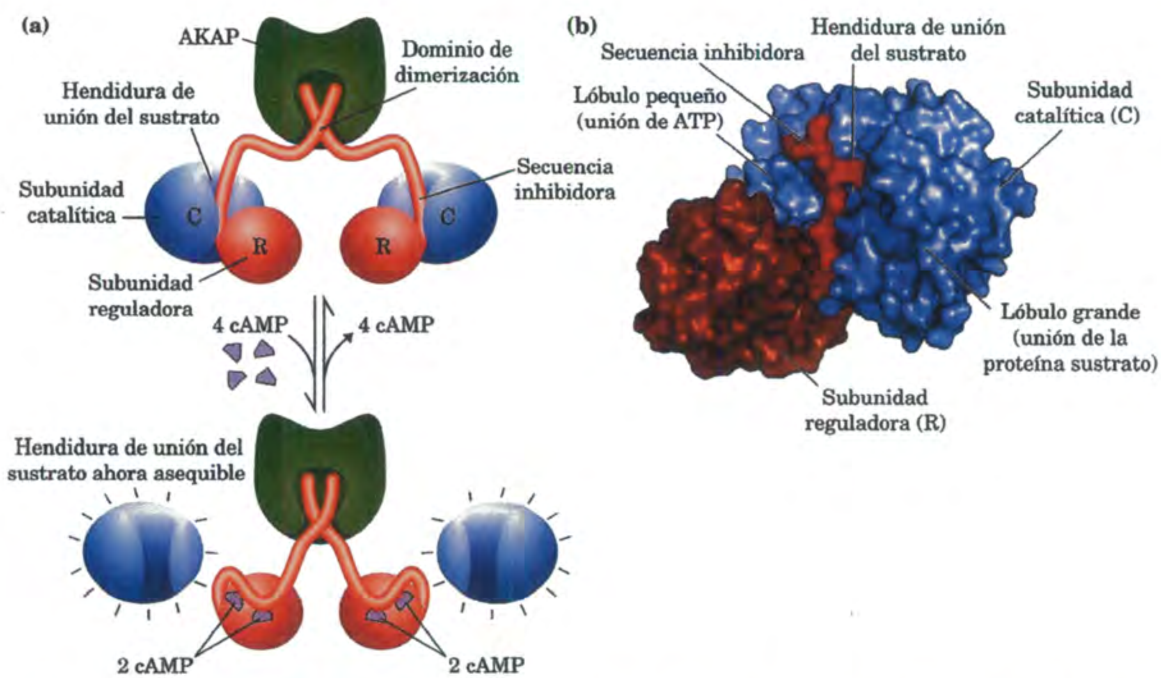


FIGURA 12–6 Activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA). **(a)** Cuando [cAMP] es baja, las dos subunidades reguladoras idénticas (R; rojo) se asocian con las dos subunidades catalíticas idénticas (C; azul). En este complejo R_2C_2, las secuencias inhibidoras de las subunidades R se encuentran en la hendidura de unión del sustrato de las subunidades C impidiendo la unión de sustratos proteicos; el complejo es, por tanto, catalíticamente inactivo. Las secuencias amino-terminales de las subunidades R interaccionan formando un dímero R_2, sitio de unión a una proteína de anclaje a una quinasa A (AKAP; verde), descrita más adelante en el texto. Cuando la [cAMP] aumenta en respuesta a una señal hormonal, cada subunidad R une dos moléculas de cAMP experimentando una importante reorganización que tira de su secuencia inhibidora alejándola de la subunidad C al tiempo que abre la hendidura de unión del sustrato y libera cada subunidad C en su forma catalíticamente activa. **(b)** Estructura cristalina que muestra parte del complejo R_2C_2 (PDB ID 1U7E): una subunidad C (azul) y parte de la subunidad R (dos tonos de rojo). Se omite por motivos de claridad a región de dimerización amino-terminal de la subunidad R. El lóbulo pequeño de C contiene el sitio de unión de ATP y el lóbulo grande rodea y define la hendidura en donde se une la proteína sustrato que experimenta fosforilación en un residuo Ser o Thr. En esta forma inactiva, la secuencia inhibidora de R (rojo brillante) bloquea la hendidura de unión del sustrato en C, inactivándola.

TABLA 12–2 Algunos enzimas y otras proteínas regulados por fosforilación dependiente de cAMP (por PKA)

Enzima/proteína	Secuencia fosforilada*	Vía/proceso regulado
Glucógeno sintasa	RASCTSSS	Síntesis de glucógeno
Fosforilasa *b* quinasa		
Subunidad α	VEFRRLSI	Degradación de glucógeno
Subunidad β	RTKRSGSV	Degradación de glucógeno
Piruvato quinasa (hígado de rata)	GVLRRASVAZL	Glucólisis
Complejo de la piruvato deshidrogenasa (tipo L)	GYLRRASV	Piruvato a acetil-CoA
Lipasa sensible a hormona	PMRRSV	Movilización de triacilglicerol y oxidación de ácidos grasos
Fosfofructoquinasa-2/fructosa 2,6-bisfosfatasa	LQRRRGSSIPQ	Glucólisis/gluconeogénesis
Tirosina hidroxilasa	FIGRRQSL	Síntesis de L-dopa, dopamina, noradrenalina y adrenalina
Histona H1	AKRKASGPPVS	Condensación de DNA
Histona H2B	KKAKASRKESYSVYVYK	Condensación de DNA
Fosfolambano cardíaco (regulador del bombeo cardíaco)	AIRRAST	Intracelular [Ca^{2+}]
Inhibidor-1 de proteína fosfatasa-1	IRRRRPTP	Desfosforilación proteica
Secuencia consenso PKA†	xR[RK]x[ST]B	Muchas

*El residuo S o T fosforilado se muestra en rojo. Todos los residuos se dan en sus símbolos de una letra (véase la Tabla 3-1).

†x es un aminoácido cualquiera; B es un aminoácido hidrofóbico cualquiera. Véase el Recuadro 3-3 para las convenciones utilizadas en la representación de las secuencias consenso.

rededor del residuo Ser o Thr que experimenta fosforilación, secuencia que los marca para la regulación por la PKA. El sitio de unión de sustrato en la hendidura de la PKA reconoce estas secuencias y fosforila sus residuos Thr o Ser. La comparación de las secuencias de diversas proteínas sustrato de la PKA ha permitido establecer la **secuencia consenso,** es decir, los residuos vecinos específicos necesarios para marcar un residuo Ser o Thr para que su fosforilación (véase la Tabla 12–2).

La transducción de señal por la adenilil ciclasa impone varias etapas que *amplifican* la señal hormonal original **(Fig. 12–7)**. Primero, la unión de una molécula de hormona a un molécula de receptor activa catalíticamente varias moléculas de G_s. A continuación, mediante la activación de una molécula de adenilil ciclasa, cada molécula de $G_{s\alpha}$ activa estimula la síntesis catalítica de *muchas* moléculas de cAMP. El segundo mensajero cAMP activa ahora la PKA, cada molécula de la cual cataliza la fosforilación de *muchas* moléculas de la proteína diana (fosforilasa *b* quinasa en la Figura 12–7). Esta quinasa activa la glucógeno fosforilasa *b*, lo que conduce a la rápida movilización de glucosa a partir del glucógeno. El efecto neto de la cascada es la amplificación de la señal hormonal en varios órdenes de magnitud, lo que da cuenta de la muy baja concentración de adrenalina (o de otra hormona) necesaria para la actividad hormonal.

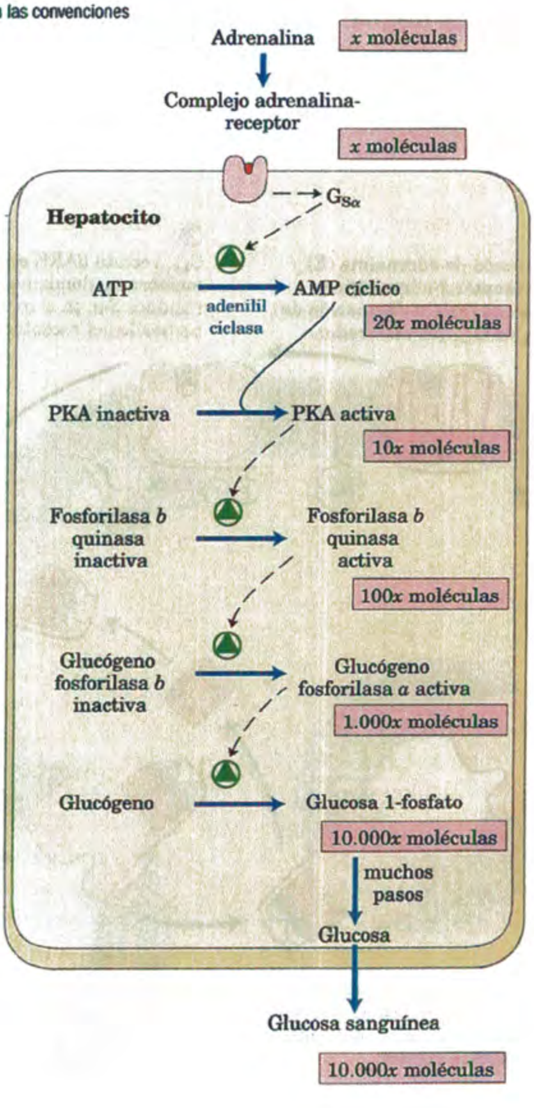


FIGURA 12–7 Cascada de la adrenalina. La adrenalina desencadena una serie de reacciones en hepatocitos en las que catalizadores activan catalizadores, dando como resultado una gran amplificación de la señal. La unión de un pequeño número de moléculas de adrenalina a los receptores β-adrenérgicos específicos en la superficie celular activa la adenilil ciclasa. El número de moléculas mostradas sólo es para ilustrar la amplificación. La realidad es probablemente muy superior. (Dado que se requieren dos moléculas de cAMP para activar la subunidad catalítica de la PKA, este paso no amplifica la señal.)

Diversos mecanismos inducen la terminación de la respuesta del receptor β-adrenérgico

Para que sea útil un sistema de transducción de señal, se ha de *desconectar* cuando ha finalizado el estímulo ya sea hormonal o de otro tipo, por lo que los mecanismos de desconexión de la señal son intrínsecos a todos los sistemas de señalización. La mayoría de sistemas también se adaptan a la presencia continuada de la señal haciéndose menos sensibles a la misma en el proceso de desensibilización. El sistema β-adrenérgico ilustra ambos mecanismos. Cuando la concentración de adenalina en la sangre disminuye por debajo de la K_d de su receptor, la hormona se disocia del receptor y este último vuelve a adoptar la conformación inactiva en la que ya no es activado por G_s.

Un segundo modo de acabar la respuesta a la estimulación β-adrenérgica es la hidrólisis del GTP unido a la subunidad G_α, catalizada por la actividad GTPasa intrínseca de la proteína G. La conversión del GTP unido en GDP favorece el retorno de G_α a la conformación en la que une las subunidades $G_{\beta\gamma}$, conformación en la que la proteína G no puede interaccionar con la adenilil ciclasa o estimularla. Esto finaliza la producción de cAMP. La velocidad de inactivación de G_s depende de la actividad GTPasa, que en el caso de G_α sola es muy débil. No obstante, las proteínas activadoras de la GTPasa (GAP) estimulan esta actividad GTPasa provocando una más rápida inactivación de la proteína G (véase el Recuadro 12–2). Las GAP pueden regularse por otros factores, provocando una fina adaptación de la respuesta a la estimulación β-adrenérgica. Un tercer mecanismo para terminar la respuesta es eliminar el segundo mensajero: hidrólisis del cAMP a 5´-AMP (que no es activo como segundo mensajero) por la **nucleótido cíclico fosfodiesterasa** (Fig. 12–4a, paso ⑦; 12–4b).

Finalmente, al acabar la ruta de señalización, los efectos metabólicos resultantes de la fosforilación enzimática son invertidos por la acción de las fofoproteína fosfatasas, que hidrolizan los residuos de Ser, Thr o Tyr fosforilados con liberación de fosfato inorgánico (P_i). Unos 150 genes del genoma humano codifican fosfoproteína fosfatasas, menos que los que codifican proteína quinasas (~500). Se sabe que algunas de estas fosfatasas están reguladas; otras pueden actuar de forma constitutiva. Cuando la [cAMP] disminuye y la PKA vuelve a su forma inactiva (paso ⑦ en la Fig. 12–4a), el equilibrio entre fosforilación y desfosforilación se inclina hacia la desfosforilación debido a estas fosfatasas.

El receptor β-adrenérgico se desensibiliza mediante fosforilación y por asociación con arrestina

Como anotábamos antes, los sistemas de transducción de señal experimentan una desensibilización cuando finaliza la señal. Un mecanismo diferente, la desensibilización, apaga la respuesta *incluso cuando persiste la señal*. En la desensibilización del receptor β-adrenérgico interviene una proteína quinasa que fosforila el receptor en el dominio intracelular que normalmente interacciona con G_s **(Fig. 12-8)**. Cuando el receptor esta ocupado por la adrenalina, la **receptor β-adrenérgico quinasa (βARK)** (también llamada a menudo **GRK2**; véase más adelante) fosforila varios residuos Ser cerca del extremo carboxilo-terminal del receptor que se encuentra en el lado citoplasmático de

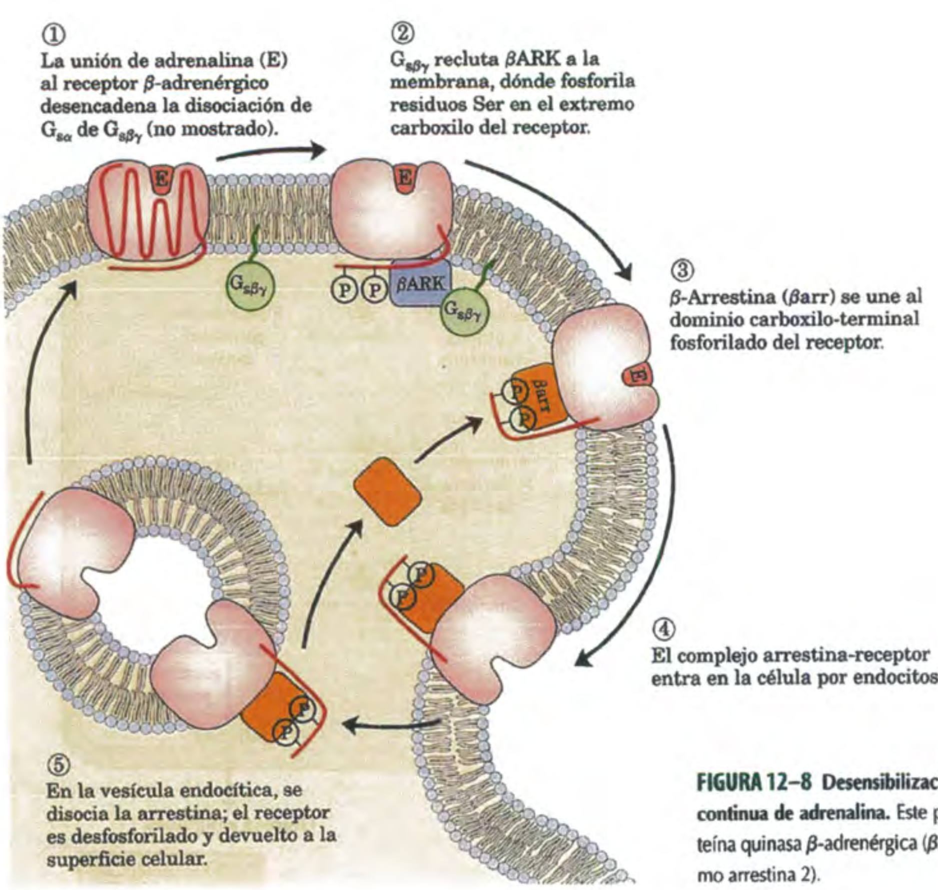


FIGURA 12–8 Desensibilización del receptor β-adrenérgico con la presencia continua de adrenalina. Este proceso esta facilitado por dos proteínas: la proteína quinasa β-adrenérgica (βARK) y la β-arrestina (βarr, también conocida como arrestina 2).

la membrana plasmática. La βARK, normalmente localizada en el citosol, se transloca a la membrana plasmática gracias a su asociación con las subunidaddes $G_{\beta\gamma}$ con lo que queda posicionada para fosforilar el receptor. La fosforilación del receptor crea un sitio de unión para la proteína **β-arrestina (βarr)**, (también denominada arrestina 2), y la unión de la β-arrestina impide de forma eficiente la interacción entre el receptor y la proteína G. La unión de la β-arrestina también facilita el secuestro del receptor, es decir, la eliminación de las moléculas de receptor de la membrana plasmática por endocitosis en pequeñas vesículas intracelulares. Los receptores en las vesículas endocíticas son finalmente desfosforilados y devueltos a la membrana plasmática, completando el circuito y resensibilizando el sistema a la adrenalina. La receptor β-adrenérgico quinasa es un miembro de una familia de **quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK),** todas las cuales fosforilan GPCR en sus dominios citoplásmicos carboxilo-terminales y juegan un papel similar al de las βARK en la desensibilización y resensibilización de sus receptores. Al menos cinco GRK diferentes y cuatro arrestinas diferentes están codificadas en el genoma humano; cada GRK puede desensibilizar un subconjunto particular de GPCR mientras que cada arrestina puede interaccionar con muchos tipos diferentes de receptores fosforilados.

El AMP cíclico actúa como segundo mensajero para muchas moléculas reguladoras

La adrenalina es sólo una de las muchas hormonas, factores de crecimiento y otras moléculas reguladoras que actúan gracias al cambio intracelular de [cAMP] y por lo tanto de la actividad de la PKA (Tabla 12–3). Por ejemplo, el glucagón se une a su receptor en las membranas plasmáticas de los adipocitos, activando (vía una proteína G_s) la adenilil ciclasa. La PKA, estimulada como resultado del aumento de [cAMP], fosforila y activa dos proteínas clave para la movilización de los ácidos grasos almacenados en la grasa (véase la Fig. 17–3).

De la misma forma, la hormona peptídica ACTH (hormona adrenocorticotrópica, también conocida como corticotropina), producida en la hipófisis anterior, se une a receptores específicos en el córtex suprarrenal, activando la adenilil ciclasa y aumentando la [cAMP] intracelular. La PKA seguidamente fosforila y activa varios enzimas que se requieren para la síntesis de cortisol y otras hormonas esteroideas. En muchos tipos celulares la subunidad catalítica de la PKA también puede desplazarse al núcleo, donde fosforila una **proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP** que altera la expresión de genes específicos regulados por cAMP.

Algunas hormonas actúan *inhibiendo* la adenilil ciclasa, *disminuyendo* los niveles de cAMP y *suprimiendo* la fosforilación de proteínas. Por ejemplo, la unión de somatostatina a su receptor desencadena la activación de una **proteína G inhibidora,** o **G_i,** estructuralmente homóloga a G_s, que inhibe la adenilil ciclasa y disminuye la [cAMP]. La somatostatina, por lo tanto, contrarresta los efectos del glucagón. En el tejido adiposo, la prostaglandina E_1 (PGE_1, véase la Fig. 10–18) inhibe la adenilil ciclasa y disminuye así la [cAMP], con lo que se hace más lenta la movilización de las reservas lipídicas desencadenada por la adrenalina y el glucagón. En otros tejidos, la PGE_1 estimula la síntesis de cAMP porque sus receptores están acoplados a la adenilil ciclasa a través de una proteína G estimuladora, G_s. En tejidos con receptores α_2-adrenérgicos, la adrenalina disminuye la [cAMP] porque los receptores están acoplados a la adenilil ciclasa a través de una proteína G inhibidora, G_i. En resumen, una señal extracelular tal como la adrenalina o la PGE_1 puede tener efectos muy diferentes en los distintos tejidos o tipos celulares, dependiendo de tres factores: el tipo de receptor en cada tejido, el tipo de proteína G (G_s o G_i) con la que se acopla el receptor y el conjunto de enzimas diana de la PKA en la célula. Al sumar las influencias que tienden a aumentar y disminuir la [cAMP], la célula consigue la integración de señales que indicamos como una característica general de los mecanismos de transducción de señales.

TABLA 12–3 Algunas señales que usan cAMP como segundo mensajero

Adrenalina (β-adrenérgico)
Corticotropina (ACTH)
Dopamina [D_1, D_2]
Glucagón
Histamina [H_2]
Hormona estimuladora del folículo (FSH)
Hormona estimuladora del melanocito (MSH)
Hormona estimuladora del tiroides (TSM)
Hormona liberadora de corticotropina (CRH)
Hormona luteinizante (LH)
Hormona paratiroidea
Prostaglandinas E_1, E_2 (PGE_1, PGE_2)
Saborizantes (dulce, amargo)
Serotonina [5-HT-1a, 5-HT-2]
Somatostatina
Sustancias olorosas (muchas)

Nota: Subtipos de receptores mostrados en corchetes. Los subtipos pueden tener diferentes mecanismos de transducción. Por ejemplo, la serotonina se detecta en algunos tejidos por los subtipos de receptores 5-HT-1a y 5-HT-1b, que actúan a través de una adenilil ciclasa y cAMP, y en otros tejidos por un subtipo de receptor 5-HT-1c, que actúa a través del mecanismo de la fosfolipasa C-IP_3 (véase la Tabla 12–4).

Un cuarto factor que explica por qué un único segundo mensajero (cAMP) puede intervenir en la transducción de tantos tipos de señales es el confinamiento del proceso de señalización a una región específica de la célula mediante **proteínas adaptadoras,** proteínas no catalíticas que mantienen juntas otras moléculas proteicas que funcionan concertadamente (se describen con mayor detalle más adelante). Las **AKAP (*A kinase anchoring proteins*;** proteínas de anclaje de la quinasa A) son proteínas adaptadoras multivalentes; una parte se une a la subunidad R de la PKA (véase la Fig. 12–6a) y la otra a una estructura específica dentro de la célula, que confina la PKA a la proximidad de tal estructura. Por ejemplo, existen AKAP específicas que unen la PKA a los microtúbulos, filamentos de actina, canales iónicos, mitocondrias o núcleos. Diferentes tipos de células tienen diferentes dotaciones de AKAP, de modo que el cAMP podría estimular la fosforilación de proteínas mitocondriales en una célula y la fosforilación de los filamentos de actina en otra. En algunos casos, una AKAP conecta la PKA con el enzima que provoca la activa-

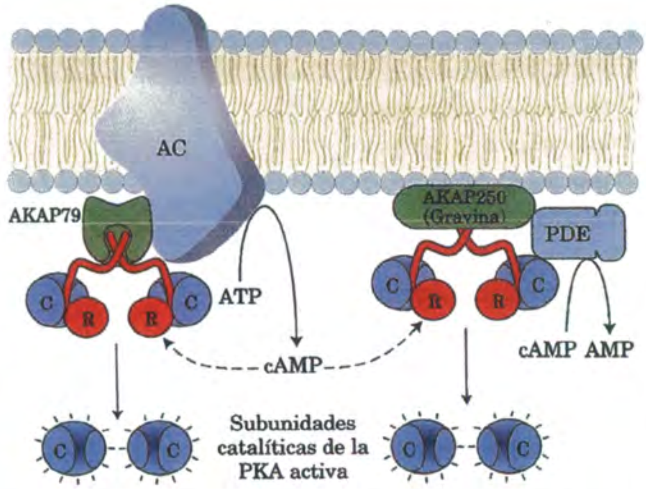


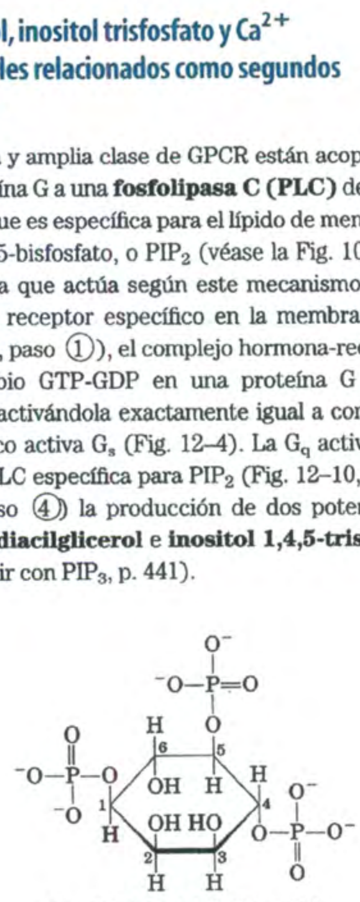
FIGURA 12–9 Nucleación de complejos supramoleculares por las proteínas de anclaje de la quinasa A (AKAP). Diversos tipos de AKAP (verde) actúan como armazones multivalentes, manteniendo las subunidades catalíticas de la PKA (azul), a través de la interacción de la AKAP con la subunidad reguladora de la PKA (rojo), próximas a una región u orgánulo de la célula. La AKAP79, en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática, une tanto PKA como adenilil ciclasa (AC). El cAMP producido por AC alcanza rápidamente y con muy poca dilución la PKA que está próxima. La AKAP79 también puede unir (no se muestra aquí) PKA, la proteína diana de la PKA (un canal iónico) y fosfoproteína fosfatasa, que elimina el fosfato de la proteína diana. AKAP250, también conocida como gravina, mantiene unida la PKA a la membrana plasmática al tiempo que también une cAMP fosfodiesterasa (PDE), la cual termina la señal de la PKA convirtiendo el cAMP en AMP. En los dos ejemplos la AKAP proporciona una alta concentración local de enzimas y segundos mensajeros, de modo que el circuito de señalización permanece altamente localizado.

ción de la PKA (adenilil ciclasa) o termina la acción de la PKA (cAMP fosfodiesterasa o fosfoproteína fosfatasa) **(Fig. 12–9)**. La gran proximidad entre estos enzimas activadores e inactivadores consigue, probablemente, que la respuesta esté muy localizada y sea muy breve. Veremos más adelante que algunas proteínas de señalización unidas a membrana (incluida la adenilil ciclasa) están localizadas en áreas específicas de la membrana en balsas o caveolas (véase la Sección 12.5)

Actualmente está claro que para comprender completamente la señalización celular, los investigadores necesitan herramientas lo suficientemente precisas para poder detectar y estudiar los aspectos espacio-temporales de los procesos de señalización a nivel celular y en tiempo real. En estudios sobre la localización intracelular de los cambios bioquímicos, la bioquímica se encuentra con la biología celular, por lo que las técnicas que cruzan este límite se han convertido en esenciales para comprender las rutas de señalización. Las sondas fluorescentes han encontrado una gran aplicación en los estudios de señalización. El etiquetado de proteínas funcionales con una marca fluorescente tal como la proteína fluorescente verde (GFP) revela sus localizaciones subcelulares (véase la Fig. 9–15a). Los cambios en el estado de asociación de dos proteínas (tales como las subunidades R y C de la PKA) pueden verse midiendo la transferencia de energía radiativa entre las sondas fluorescentes unidas a cada proteína, técnica que se denomina transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET; Recuadro 12–3).

Diacilglicerol, inositol trisfosfato y Ca^{2+} tienen papeles relacionados como segundos mensajeros

Una segunda y amplia clase de GPCR están acoplados a través de una proteína G a una **fosfolipasa C (PLC)** de la membrana plasmática que es específica para el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, o PIP_2 (véase la Fig. 10–16). Cuando una hormona que actúa según este mecanismo (Tabla 12–4) se une a su receptor específico en la membrana plasmática (**Fig. 12–10**, paso ①), el complejo hormona-receptor cataliza el intercambio GTP-GDP en una proteína G asociada, $\mathbf{G_q}$ (paso ②), activándola exactamente igual a como el receptor β-adrenérgico activa G_s (Fig. 12–4). La G_q activada, a su vez, activa una PLC específica para PIP_2 (Fig. 12–10, paso ③), que cataliza (paso ④) la producción de dos potentes segundos mensajeros **diacilglicerol** e **inositol 1,4,5-trisfosfato** o $\mathbf{IP_3}$ (no confundir con PIP_3, p. 441).



Inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3)

TABLA 12–4 Algunas señales que actúan a través de la fosfolipasa C, IP_3 y Ca^{2+}

Acetilcolina [muscarínico M_1]	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Luz (*Drosophila*)
Agonistas α_1-adrenérgicos	Glutamato	Oxitocina
Angiogenina	Histamina [H_1]	Péptido liberador de gastrina
Angiotensina II	Hormona liberadora de gonadotropina (GRH)	Serotonina [5-HT-1c]
ATP [P_{2x} y P_{2y}]	Hormona liberadora de tirotropina (TRH)	Vasopresina
Auxina		

Nota: Los subtipos de receptores están entre corchetes; véase la nota al pie de la Tabla 12-3.

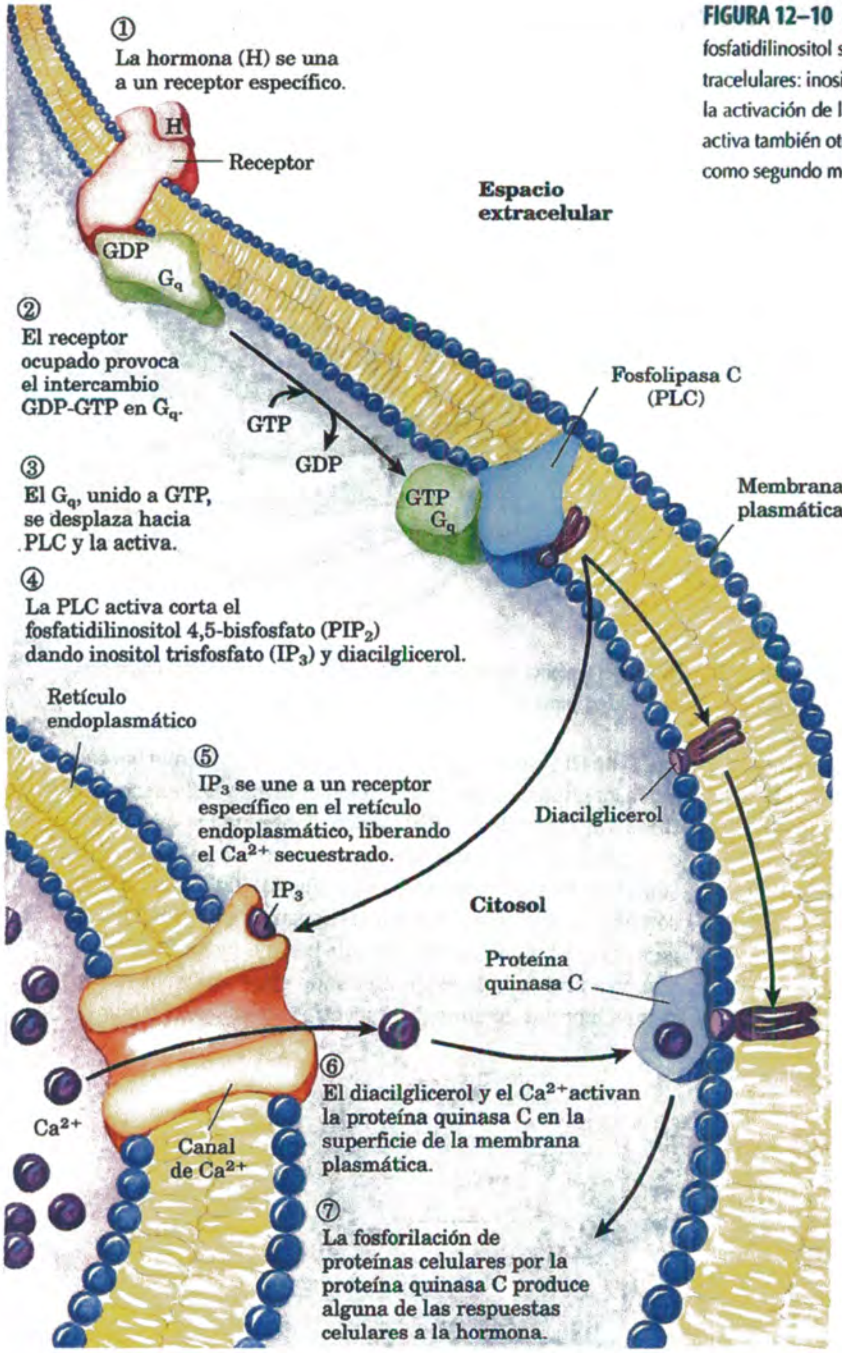


FIGURA 12–10 Fosfolipasa C activada por hormona e IP_3. En el sistema del fosfatidilinositol sensible a hormona se producen dos segundos mensajeros intracelulares: inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol. Ambos contribuyen a la activación de la proteína quinasa C. Al incrementar la [Ca^{2+}] citosólica, IP_3 activa también otros enzimas dependientes de Ca^{2+}; así el Ca^{2+} actúa también como segundo mensajero.

El inositol trisfosfato, un producto hidrosoluble, difunde desde la membrana plasmática al retículo endoplasmático (RE), donde se une a receptores específicos de canales de Ca^{2+} regulados por IP_3 provocando su apertura. La acción de la bomba SERCA (véase la Fig. 11–36) asegura que la [Ca^{2+}] en el RE es órdenes de magnitud superior a la citosólica, de manera que cuando se abren los canales regulados por Ca^{2+} éste fluye rápidamente dentro al citosol (Fig. 12–10, paso ⑤), y la [Ca^{2+}] aumenta abruptamente hasta 10^{-6} M. Un efecto de la [Ca^{2+}] elevada es la activación de la **proteína quinasa C (PKC)**. El diacilglicerol coopera con el Ca^{2+} en la activación de la PKC, por lo que también actúa como un segundo mensajero (paso ⑥). La activación implica el desplazamiento de un dominio de la PKC (el dominio del pseudosustrato) lejos de su localización en la región de unión del sustrato del enzima, lo que permite que el enzima se una y fosforile proteínas que contienen una secuencia consenso de la PK C (residuos de Ser o Thr incrustados en una secuencia de aminoácidos reconocida por la PKC (paso ⑦). Existen varios isozimas de la PKC, cada uno de ellos con una distribución tisular, especificidad de proteínas diana y función características. Entre sus dianas se cuentan proteínas del citoesqueleto, enzimas y proteínas nucleares que regulan la expresión génica. Tomados en su conjunto esta familia de enzimas tiene una amplia gama de acciones celulares que afectan, por ejemplo, la función neuronal e inmune y la regulación de la división celular.

RECUADRO 12-3 MÉTODOS FRET: Bioquímica visualizada en una célula viva

Las sondas fluorescentes se utilizan habitualmente para detectar cambios bioquímicos rápidos en células vivas individuales. Se pueden diseñar para que den una información prácticamente instantánea (en nanosegundos) sobre los cambios en la concentración intracelular de un segundo mensajero o en la actividad de una proteína quinasa. Además, la microscopia de fluorescencia tiene suficiente resolución para indicar en qué parte de la célula tienen lugar tales cambios. En un procedimiento muy utilizado, las sondas fluorescentes son sustancias derivadas de una proteína fluorescente natural, la **proteína fluorescente verde (GFP)** de la medusa *Aequorea victoria* (Fig. 1).

Cuando se excita por un fotón de luz, la GFP emite un fotón (esto es, fluoresce) en la zona verde del espectro. La GFP es un barril β de 11 cadenas y el centro de absorción/emisión de luz de la proteína (su cromóforo) comprende el tripéptido Ser^{65}–Tyr^{66}–Gly^{67}– localizado dentro del barril (Fig. 2). La oxidación del tripéptido está catalizada por la propia GFP (Fig. 3) sin necesidad de otras proteínas o cofactores (aparte del oxígeno molecular), por lo que es posible clonar la proteína en prácticamente cualquier célula en donde se puede utilizar como marcador de fluorescencia por sí misma o para cualquier otra proteína con la que se haya fusionado (véase la Fig. 9–15a). Mediante ingeniería genética del gen de GFP es posible obtener variantes de esta proteína con diferentes espectros de fluorescencia. Por ejemplo, en la proteína fluorescente amarilla (YFP), Ala^{206} de GFP se reemplaza por un residuo Lys, lo que hace variar la longitud de onda de absorción de la luz y la fluorescencia. Otras variantes de la GFP tienen fluorescencia azul (BFP) o púrpura (CFP), mientras que una proteína relacionada (mRFP1) da una fluorescencia roja (Fig. 4). GFP y sus variantes son estructuras compactas que retienen su capacidad de plegarse en su conformación nativa de barril β incluso fusionadas con otra proteína. Se están utilizando estas proteínas fluorescentes híbridas como reglas espectroscópicas para medir dis-

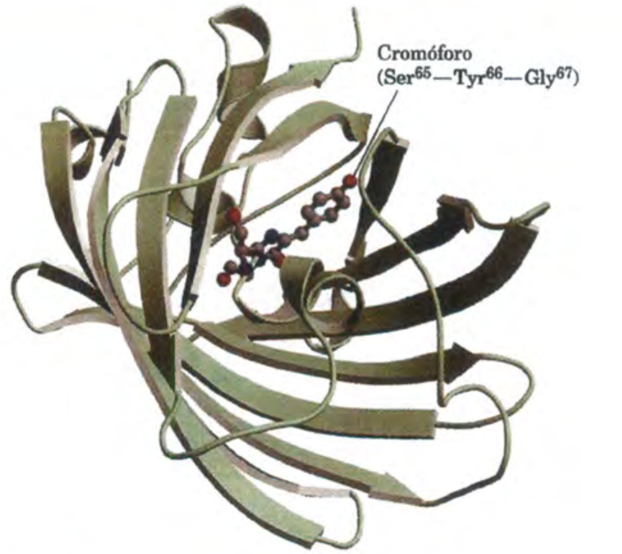


FIGURA 2 Proteína fluorescente verde (GFP), con el cromóforo fluorescente mostrado en forma de varillas y bolas (de PDB ID 1GFL).

FIGURA 1 *Aequorea victoria*, una medusa abundante en Puget Sound, Estado de Washington.

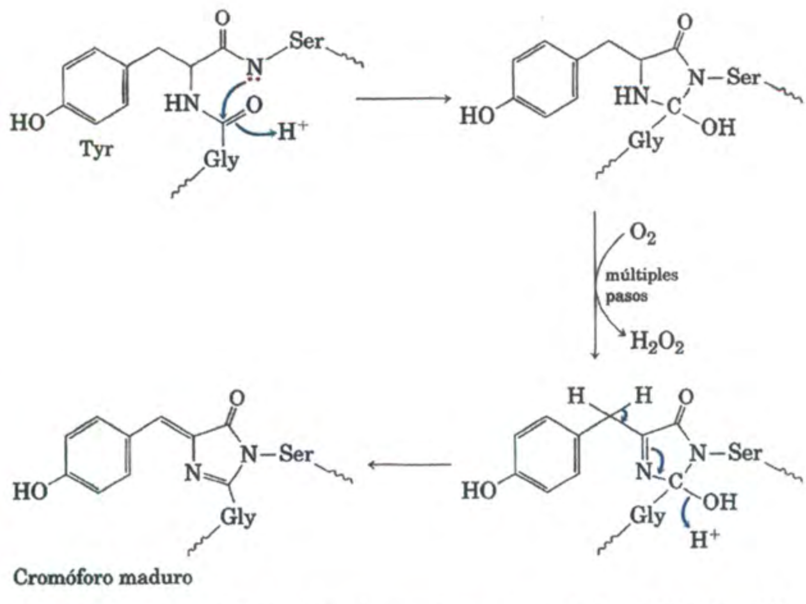


FIGURA 3 El cromóforo de GFP proviene de una serie de tres aminoácidos: $-Ser^{65}$–Tyr^{66}–Gly^{67}–. La maduración del cromóforo implica un reordenamiento interno acoplado a una reacción de oxidación que tiene lugar en múltiples etapas. Aquí se muestra un mecanismo abreviado.

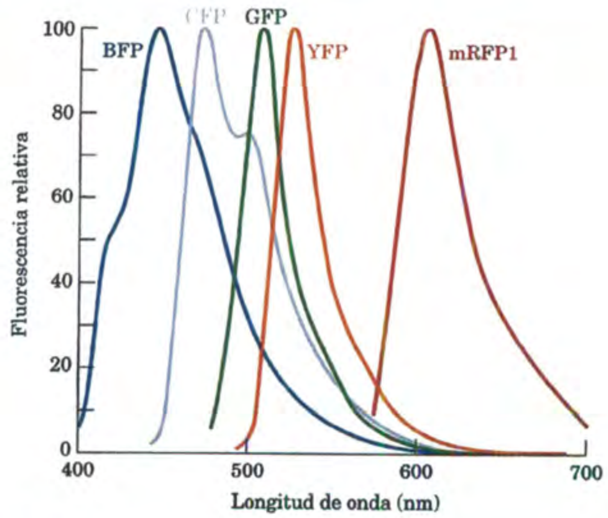


FIGURA 4 Espectro de emisión de variantes de GFP.

tancias entre componentes que interaccionan dentro de una célula e indirectamente para medir concentraciones locales de compuestos que modifican la distancia entre dos proteínas.

Una molécula fluorescente excitada, tal como GFP o YFP, puede utilizar la energía del fotón absorbido de dos maneras: (1) por fluorescencia, emitiendo un fotón de longitud de onda ligeramente superior (menor energía) que la de la luz excitante, o (2) por **transferencia de energía de resonancia de fluorescencia** (fluorescence resonance energy transfer: **FRET**) no radiactiva, en la que la energía de la molécula excitada (el dador) pasa directamente a una molécula próxima (el aceptor) *sin emisión de un fotón*, excitando el aceptor (Fig. 5). El aceptor puede ahora decaer a su estado basal por fluorescencia; el fotón emitido tiene una longitud de onda mayor (menor energía) que la luz de excitación original y que la emisión de fluorescencia del dador. Este segundo modo de decaimiento (FRET) sólo es posible cuando el dador y el aceptor están próximos (entre 1 y 50 Å); la eficiencia de la FRET es inversamente proporcional a la *sexta potencia* de la distancia entre el dador y el aceptor. Así, variaciones muy pequeñas en la distancia entre dador y aceptor se manifiestan como grandes variaciones de FRET, medida como la fluorescencia de la molécula aceptora cuando se excita el dador. Con detectores de luz suficientemente sensibles, esta señal de fluorescencia puede localizarse en regiones específicas de una célula viva individual.

Se ha utilizado la FRET para medir la [cAMP] en células vivas. El gen de la GFP se fusiona con el de la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa dependiente de cAMP mientras que el gen de la BFP se fusiona con el de la subunidad catalítica (C) (Fig. 6). Cuando se expresan estas dos proteínas híbridas en una célula, BFP (dador; excitación a 380 nm; excitación a 460 nm) y GFP (aceptor; excitación a 475 nm; emisión a 545 nm) en la PKA inactiva (tetrámero R_2C_2) están suficientemente cerca para experimentar FRET. Dondequiera

(*continúa en la página siguiente*)

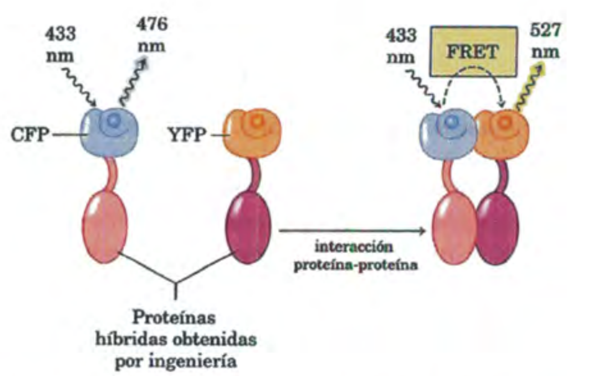


FIGURA 5 Cuando la proteína dadora (CFP) se excita con luz monocromática de longitud de onda 433 nm, emite luz fluorescente a 476 nm (izquierda). Cuando la proteína (rojo) fusionada con CFP interacciona con la proteína fusionada con YFP (púrpura), esa interacción acerca lo suficiente CFP e YFP para que sea posible la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre ellas. Ahora bien, cuando CFP absorbe luz de 433 nm, en lugar de emitir fluorescencia a 476 nm, transfiere la energía directamente a YFP, que fluoresce entonces a su longitud de onda de emisión característica, 527 nm. La razón entre la emisión de luz a 527 y 476 nm es, por tanto, una medida de la interacción de la proteína roja y la púrpura.

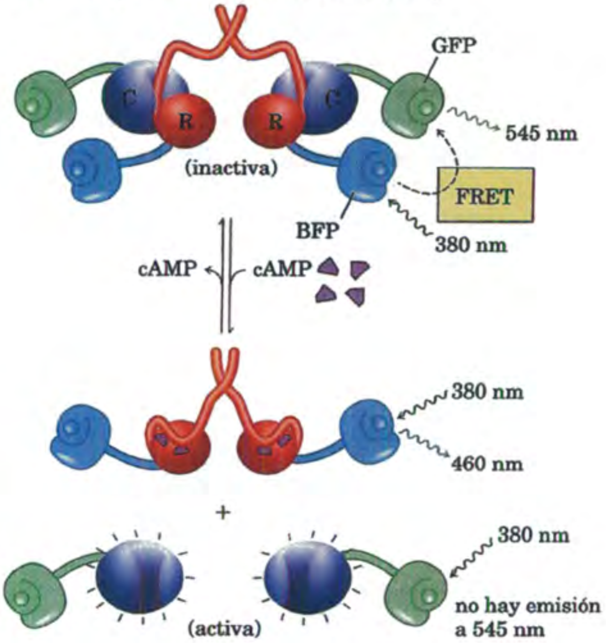


FIGURA 6 Determinación de la [cAMP] con FRET. La fusión génica crea proteínas híbridas que muestran FRET cuando las subunidades reguladoras (R) y catalíticas (C) de la PKA están asociadas (baja [cAMP]). Cuando aumenta [cAMP], las subunidades se disocian, por lo que cesa la FRET. La razón de la emisión a 460 nm (disociada) y 545 nm (unidas) ofrece así una medida sensible de la [cAMP].

RECUADRO 12–3 MÉTODOS FRET: Bioquímica visualizada en una célula viva *(continuación de la página anterior)*

que aumente la [cAMP] en la célula, el complejo R_2C_2 se disocia en R_2 y 2C perdiéndose la señal FRET, ya que dador y aceptor están ahora demasiado alejados para que FRET sea eficiente. Vista al microscopio de fluorescencia, la región de [cAMP] más elevada tiene una señal de GFP mínima y una señal más elevada de BFP. La determinación de la razón de emisión a 460 nm y 545 nm da una medida sensible del cambio en la [cAMP]. Determinando esta razón en todas las regiones de la célula se puede generar una imagen de color falso de la célula en la que la razón, o [cAMP] relativa, se representa por la intensidad del color. Imágenes registradas a intervalos de tiempo determinados ponen de manifiesto los cambios en la [cAMP] en función del tiempo.

Se ha utilizado una variante de esta tecnología para medir la actividad de la PKA en una célula viva (Fig. 7). Se ha creado una diana de fosforilación para la PKA mediante la producción de una proteína híbrida que contiene cuatro elementos: YFP (aceptor); un péptido corto con un residuo Ser rodeado por la secuencia consenso para la PKA; un dominio de unión de Ⓟ–Ser (denominado 14-3-3) y CFP (dador). Cuando el residuo de Ser no es tá fosforilado, 14-3-3 no tiene afinidad por el residuo Ser, por lo que la proteína híbrida se encuentra en la forma extendida, con el dador y el aceptor demasiado alejados para generar una señal FRET. En el lugar de la célula en el que la PKA es activa fosforila el residuo Ser de la proteína híbrida, de modo que 14-3-3 se une a Ⓟ–Ser. En esta operación YFP y CFP se acercan entre sí, con lo que se detecta una señal FRET con el microscopio de fluorescencia que revela la presencia de PKA activa.

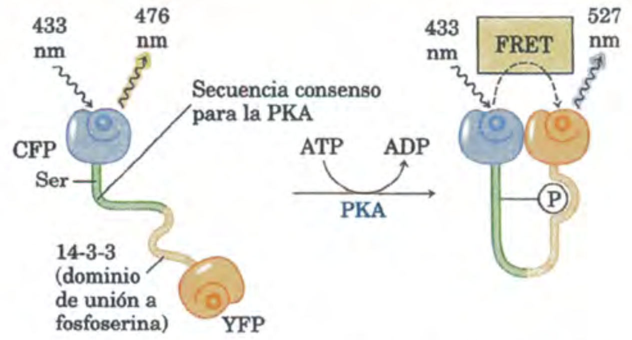
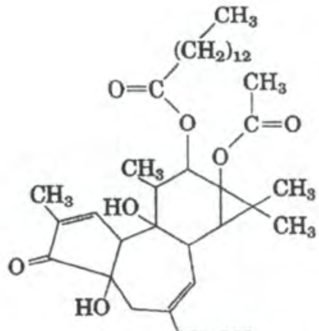


FIGURA 7 Determinación de la actividad de la PKA con FRET. Una proteína obtenida por ingeniería genética une YFP y CFP a través de un péptido que contiene un residuo Ser rodeado por la secuencia consenso de fosforilación por la PKA, y el dominio 14-3-3 de unión a Ⓟ–Ser. La PKA activa fosforila el residuo Ser, que se acopla con el dominio de unión 14-3-3 situando las proteínas fluorescentes suficientemente cerca para permitir la existencia de FRET que revela la presencia de PKA activa.

La acción de un grupo de compuestos conocidos como **promotores tumorales** se puede atribuir a sus efectos sobre la PKC. Los más estudiados de ellos son los ésteres de forbol, compuestos sintéticos activadores potentes de la PKC. Mimetizan, aparentemente, el diacilglicerol celular como segundo mensajero, pero a diferencia de los diacilgliceroles naturales no son eliminados rápidamente por el metabolismo. Gracias a la continua activación de la PKC, estos promotores tumorales sintéticos interfieren con la regulación normal del crecimiento y la división celulares (discutida en la Sección 12.12) promoviendo así la formación de tumores. ■



Acetato de miristilforbol (un éster del forbol)

El calcio es un segundo mensajero que puede estar localizado en el espacio y el tiempo

Existen muchas variaciones del esquema básico de la señalización por Ca^{2+}. En muchos tipos celulares que responden a señales extracelulares, el Ca^{2+} se utiliza como segundo mensajero que desencadena respuestas intracelulares, tales como la exocitosis en neuronas y células endocrinas, contracción muscular o reordenamiento del citoesqueleto durante el movimiento ameboide.

En células no estimuladas, la [Ca^{2+}] citosólica se mantiene en un nivel muy bajo ($<10^{-7}$ M) por acción de las bombas de Ca^{2+} en el RE, en la mitocondria y en la membrana plasmática (tal como se discute más adelante). Los estímulos hormonales neuronales o de otro tipo provocan una entrada de Ca^{2+} al interior de la célula a través de los canales específicos de Ca^{2+} en la membrana plasmática o liberan el Ca^{2+} retenido por el RE o la mitocondria; en ambos casos aumentan la [Ca^{2+}] citosólica y desencadenan la respuesta celular.

Los cambios en la [Ca^{2+}] intracelular son detectados por proteínas de unión de Ca^{2+} que regulan un conjunto de enzimas dependientes de Ca^{2+}. La **calmodulina (CaM;** M_r 17.000) es una proteína acídica con cuatro sitios de unión de Ca^{2+} de alta afinidad. Cuando la [Ca^{2+}] intracelular alcanza valores de 10^{-6} M (1 μM), la unión del calcio a la calmodulina provoca un cambio de conformación en la proteína **(Fig. 12–11a)**. La calmodulina se asocia con una gran variedad de proteínas y, en su estado unido al Ca^{2+}, modula sus actividades (Fig. 12–11b). La

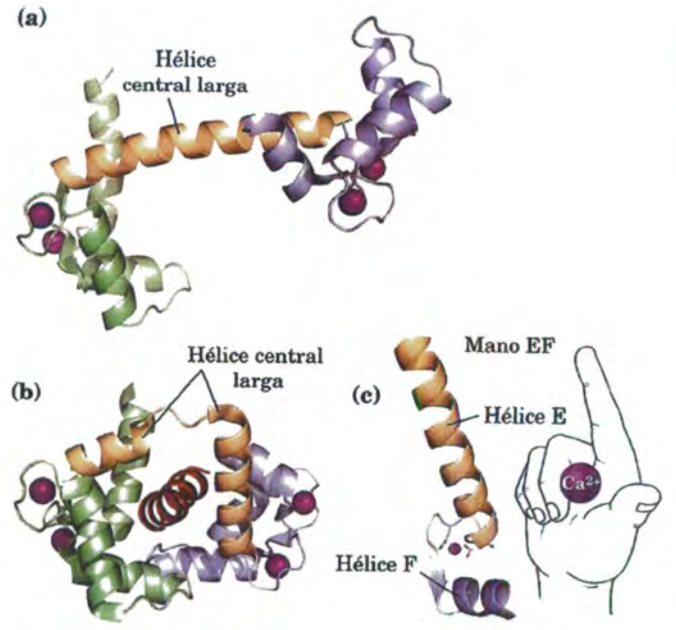


FIGURA 12–11 Calmodulina. Ésta es la proteína que interviene en muchas reacciones enzimáticas estimuladas por Ca^{2+}. La calmodulina tiene cuatro sitios de unión de Ca^{2+} de elevada afinidad ($K_d \approx$ alrededor de 0,1 a 1 μM). **(a)** Modelo de cintas de la estructura cristalina de la calmodulina (PDB ID 1CLL). Los cuatro sitios de unión de Ca^{2+} están ocupados por Ca^{2+} (púrpura). El dominio amino-terminal está a la izquierda; el carboxilo-terminal, a la derecha. **(b)** La calmodulina asociada con un dominio helicoidal (rojo) de uno de los muchos enzimas que regula, la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (PDB ID 1CDL). Obsérvese que la larga hélice a central de la calmodulina visible en (a) se ha doblado sobre sí misma al unirse al dominio helicoidal del sustrato. La hélice central de la calmodulina es claramente más flexible en solución que en el cristal. **(c)** Cada uno de los cuatro sitios de unión de Ca^{2+} se sitúa en un motivo hélice-lazo-hélice denominado mano EF, que también se encuentra en otras muchas proteínas fijadoras de Ca^{2+}.

calmodulina es un miembro de una familia de proteínas que unen Ca^{2+}, entre las que también se encuentra la troponina (p. 178) que provoca la contracción del músculo esquelético como respuesta al aumento de la [Ca^{2+}]. Esta familia comparte una característica de la estructura de fijación de Ca^{2+}: la mano EF (Fig. 12–11c).

La calmodulina es también una subunidad integral de las **proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina** (**CaM quinasas** tipos I a IV). Cuando la [Ca^{2+}] intracelular aumenta en respuesta a un estímulo, la calmodulina une Ca^{2+}, experimenta un cambio en la conformación y activa la CaM quinasa. La quinasa entonces fosforila a un grupo de proteínas diana, regulando sus actividades. La calmodulina es también una subunidad reguladora de la fosforilasa *b* quinasa de músculo, que se activa por Ca^{2+}. Así, el Ca^{2+} desencadena las contracciones del músculo que requieren ATP mientras activa al mismo tiempo la degradación del glucógeno, lo que proporciona combustible para la síntesis de ATP. Se conocen otros muchos enzimas que también están modulados por Ca^{2+} a través de la calmodulina. (Tabla 12–5). La actividad del segundo mensajero Ca^{2+}, al igual que la del cAMP, puede estar restringida en el espacio; después de que su liberación provoque una respuesta local, se elimina el Ca^{2+} antes de que pueda difundir a partes distantes de la célula.

TABLA 12–5 Algunas proteínas reguladas por Ca^{2+} y calmodulina
Adenilil ciclasa (cerebro)
Ca^{2+} ATPasa (bomba de Ca^{2+}) de la membrana plasmática
Calcineurina (fosfoproteína fosfatasa 2B)
cAMP fosfodiesterasa
Canal de Na^+ dependiente de Ca^{2+} (*Paramecium*)
Canal liberador de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático
Canal olfativo de entrada regulada por cAMP
Canales de Na^+ y Ca^{2+} de entrada regulada por cGMP (bastones y conos)
Fosfoinositol 3-quinasa
Glutamato descarboxilasa
NAD^+ quinasa
Óxido nítrico sintasa
Proteína quinasas dependientes de Ca^{2+} / calmodulina (CaM quinasas I a IV)
Quinasas de la cadena ligera de miosina
RNA helicasa (p68)

Muy frecuentemente, la [Ca^{2+}] no sólo sube y a continuación decae, sino que oscila en períodos de varios segundos (**Fig. 12–12**), incluso cuando la concentración extracelular de la hormona desencadenante permanece constante. En el mecanismo según el cual se producen las oscilaciones de la [Ca^{2+}] interviene probablemente una regulación por retroalimentación del Ca^{2+} sobre alguna parte del mecanismo de liberación de Ca^{2+}. Cualquiera que sea el mecanismo, el efecto es que una clase de señal (concentración de hormona, por ejemplo) se convierte en otra (frecuencia y amplitud de "puntas" de la [Ca^{2+}] intracelular). Otra variación es la presencia de "blips" (irregularidades momentáneas), "puffs" (borlas) y "ondas", que son aumentos transitorios de la [Ca^{2+}] limitados a regiones subcelulares específicas (**Fig. 12–13**). La señal de Ca^{2+} disminuye a medida que el Ca^{2+} difunde alejándose de la fuente inicial (el canal de Ca^{2+}), es secuestrado en el RE o se bombea fuera de la célula.

Hay un intercambio de mensajes significativo entre los sistemas de señalización por Ca^{2+} y por cAMP. En algunos tejidos, tanto el enzima que produce cAMP (adenilil ciclasa) como el que lo degrada (fosfodiesterasa) son estimulados por Ca^{2+}. Los cambios en el tiempo y en el espacio de la [Ca^{2+}] pueden producir por tanto cambios transitorios y localizados en la [cAMP]. Ya hemos mencionado que la PKA, el enzima que responde a cAMP, es a menudo parte de un complejo supramolecular muy localizado ensamblado sobre proteínas armazón tales como las AKAP. Esta localización subcelular de los enzimas diana, combinada con los gradientes temporales y espaciales de la [Ca^{2+}] y de [cAMP], permiten que la célula responda a una o varias señales con cambios metabólicos sutilmente matizados, que están localizados en el espacio y en el tiempo.

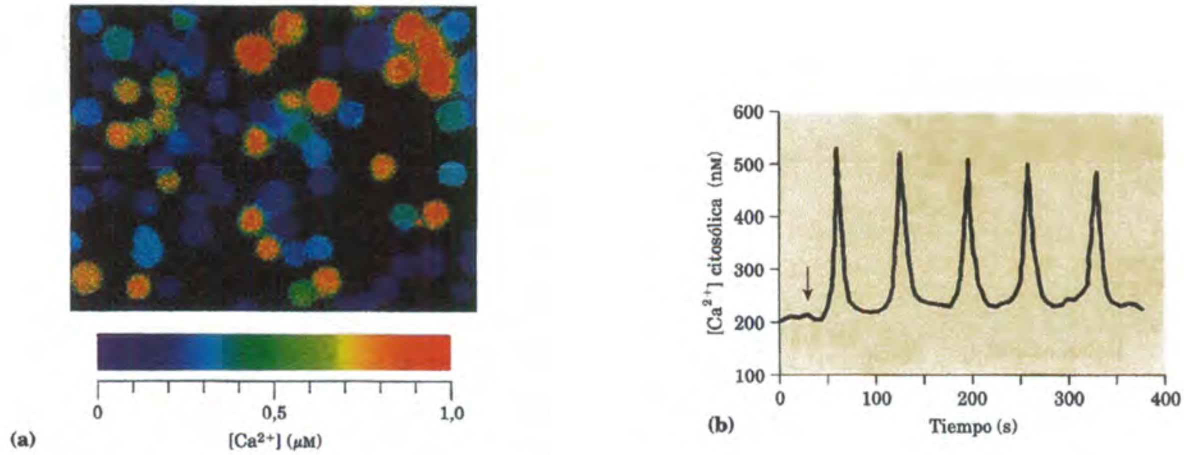


FIGURA 12–12 Desencadenamiento de oscilaciones en $[Ca^{2+}]$ intracelular por señales extracelulares. **(a)** Se deja que un colorante (fura) cuya fluorescencia cambia cuando une Ca^{2+} difunda dentro de las células, y su producción instantánea de luz es medida por microscopia de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia se representa por el color; la escala de color relaciona intensidad de color con $[Ca^{2+}]$, lo que permite determinar la $[Ca^{2+}]$ absoluta. En este caso, los timocitos (células del timo) se han estimulado con ATP extracelular, que incrementa su $[Ca^{2+}]$ interna. Las células son heterogéneas en sus respuestas; algunas tiene una $[Ca^{2+}]$ intracelular elevada (rojo), mientras que otras mucho más baja (azul). **(b)** Cuando dicha sonda se usa en un hepatocito aislado, se observa que el agonista noradrenalina (añadido en la flecha) provoca oscilaciones de $[Ca^{2+}]$ desde 200 a 500 nm. Oscilaciones similares son inducidas en otros tipos celulares por otras señales extracelulares.

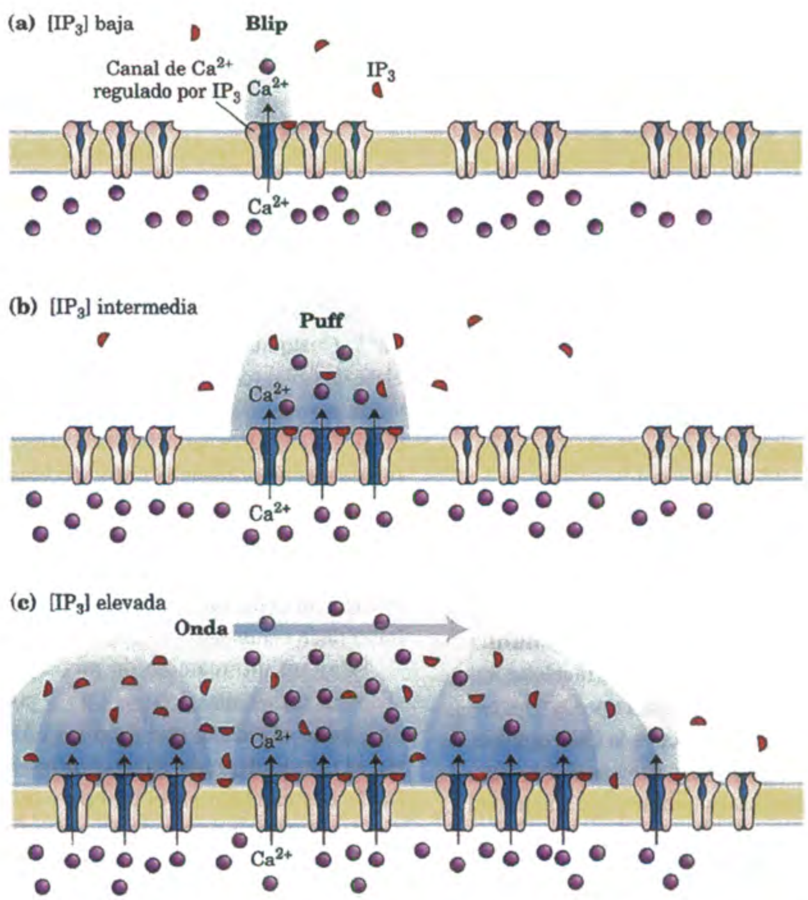


FIGURA 12–13 Incrementos transitorios y muy localizados de la $[Ca^{2+}]$. **(a)** Los canales de Ca^{2+} regulados por IP_3 del retículo endoplasmático se encuentran formando agrupaciones, cada una de las cuales puede responder de manera independiente a la señal de IP_3. Un estímulo relativamente débil que produce un pequeño aumento en la $[IP_3]$ puede hacer que se abra brevemente un solo canal, lo que da lugar a irregularidades ("blips") transitorias y localizadas de la $[Ca^{2+}]$. **(b)** Un estímulo algo más fuerte que genera un incremento mayor de la $[IP_3]$ puede hacer que se abran todos los canales de Ca^{2+} de un agrupamiento, lo que produce una borla ("puff") en la que el aumento de la $[Ca^{2+}]$, su duración y el área (volumen) afectados son mayores que en un blip. **(c)** Un puff suficientemente grande produce una elevada $[Ca^{2+}]$ sobre un área suficientemente grande que puede incluir otros agrupamientos de canales de Ca^{2+}. La abertura de los canales en agrupamientos cercanos propaga este efecto, siendo el resultado una onda de elevada $[Ca^{2+}]$ que se propaga a lo largo del RE.

RESUMEN 12.2 Receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros

- Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) actúan a través de proteínas G homotriméricas. Al unir el ligando los GPCR catalizan el intercambio de GTP por GDP en una proteína G asociada, forzando la disociación de la subunidad G_α; a continuación G_α estimula o inhibe la actividad de un enzima efector, cambiando la concentración de su producto el segundo mensajero.
- El receptor β-adrenérgico, activa una proteína G estimuladora, G_s, que activa así la adenilil ciclasa y aumenta la concentraciòn del segundo mensajero cAMP. El cAMP estimula la proteína quinasa dependiente de cAMP para fosforilar enzimas clave, cambiando sus actividades.
- Cascadas enzimáticas, en las que una única molécula de hormona activa un catalizador que a su vez activa otro catalizador y así sucesivamente, dan como resultado una gran amplificación de la señal; esto es característico de todos los sistemas receptores de hormonas.
- La concentración de AMP cíclico es reducida finalmente por la cAMP fosfodiesterasa y G_s se hace inactivo por hidrólisis de su GTP unido a GDP, actuando como un conmutador binario autolimitante.
- Cuando persiste la señal de la adrenalina, la proteína quinasa específica del receptor β-adrenérgico y la β-arrestina desensibilizan temporalmente el receptor y provocan su transporte a vesículas intracelulares.
- Algunos receptores estimulan la acenilil ciclasa a través de G_s; otros la inhiben a través de G_i. De esta forma la [cAMP] refleja el entrada coordinada de de dos (o más) señales.
- Proteínas adaptadoras no catalíticas tales como las AKAP mantienen juntas las proteínas que intervienen en un proceso de señalización, aumentando la eficiencia de sus interacciones y, en algunos casos, confinando el proceso a una localización subcelular específica.
- Algunos GPCR actúan a través de la fosfolipasa C que rompe el PIP_2 en diacilglicerol e IP_3. El IP_3 aumenta la $[Ca^{2+}]$ en el citosol gracias a la apertura de los canales de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático. El Ca^{2+} junto con el diacilglicerol activan la proteína quinasa C, que fosforila y cambia la actividad de proteínas celulares específicas. La $[Ca^{2+}]$ celular también regula (a menudo a través de la calmodulina) otros muchos enzimas y proteínas que intervienen en la secreción, en reordenamientos esqueléticos o en la contracción.

12.3 Receptores tirosina quinasas

Los **receptores tirosina quinasas (RTK)**, que constituyen una gran familia de receptores de la membrana plasmática con actividad proteína quinasa intrínseca, transducen señales extracelulares mediante un mecanismo fundamentalmente diferente al de los GPCR.

Los RTK tienen un dominio de unión a ligando en la cara extracelular de la membrana plasmática y un sitio activo enzimático en el lado citosólico, con los dos dominios conectados por un único segmento transmembrana. El dominio citoplasmático es una proteína quinasa que fosforila residuos de Tyr de proteínas diana específicas; es, por tanto una tirosina quinasa. Los receptores de insulina y del factor de crecimiento epidérmico son prototipos de este grupo.

La estimulación del receptor de insulina inicia una cascada de reacciones de fosforilación de proteínas

La insulina regula tanto enzimas metabólicos como la expresión génica: la insulina no entra en las células pero inicia una señal que discurre por un camino ramificado desde el receptor de la membrana plasmática a enzimas sensibles a la insulina en el citosol y hasta el núcleo, donde estimula la transcripción de genes específicos. La proteína del receptor de insulina activo (INS-R) consiste en dos subunidades α idénticas que sobresalen de la cara externa de la membrana plasmática y dos subunidades β transmembrana con su extremo carboxilo sobresaliendo dentro del citosol **(Fig. 12–14)**. Las subunidades α contienen el dominio de unión a insulina, mientras que los dominios intracelulares de las subunidades β contienen la actividad proteína quinasa que transfiere un grupo fosforilo desde el ATP al grupo hidroxilo de residuos Tyr en proteínas diana específicas. La señalización a través de INS-R empieza cuando la unión de insulina activa la actividad Tyr quinasa y cada subunidad β fosforila tres residuos Tyr críticos cerca del extremo carboxilo de la otra subunidad β en el dímero $(\alpha\beta)_2$. Esta **autofosforilación** abre el sitio activo, permitiendo que el enzima fosforile residuos Tyr de otras proteínas diana. El mecanismo de activación de la proteína quinasa del INS-R es similar al descrito para la PKA y la PKC: una región del dominio citoplasmático (una secuencia autoinhibidora) que tapa normalmente el sitio activo después de ser fosforilada se desplaza fuera del sitio activo, abriendo el sitio para la unión de proteínas diana (Fig. 12–14)

Una de las proteínas diana de INS-R (**Fig. 12–15**, paso ①) es el sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1; paso ②). Una vez fosforilado en varios de sus residuos Tyr, IRS-1 pasa a ser el punto de nucleación de un complejo de proteínas (paso ③) que transportan el mensaje desde el receptor de insulina a dianas finales en el citosol y el núcleo, a través de largas series de proteínas intermediarias. Primero, un residuo Ⓟ–Tyr de IRS-1 es unido por el **dominio SH2** de la proteína Grb2. (SH2 es una abreviación de *S*rc *h*omology *2*, así llamado porque la secuencia de un dominio SH2 es similar a un dominio de otra proteína Tyr quinasa llamada Src). Varias proteínas de señalización contienen dominios SH2, todos los cuales unen residuos Ⓟ–Tyr de otra proteína. Grb2 es una proteína adaptadora sin actividad enzimática intrínseca. Su función es poner en contacto dos proteínas (en este caso IRS-1 y la proteína Sos) que han de interaccionar para permitir la transducción de señal. Además de su dominio SH2 (de unión a Ⓟ–Tyr), Grb2 también contiene un segundo dominio de unión de proteína, SH3, que se une a regiones ricas en residuos Pro de Sos y recluta Sos al complejo proteico en formación. Cuan-

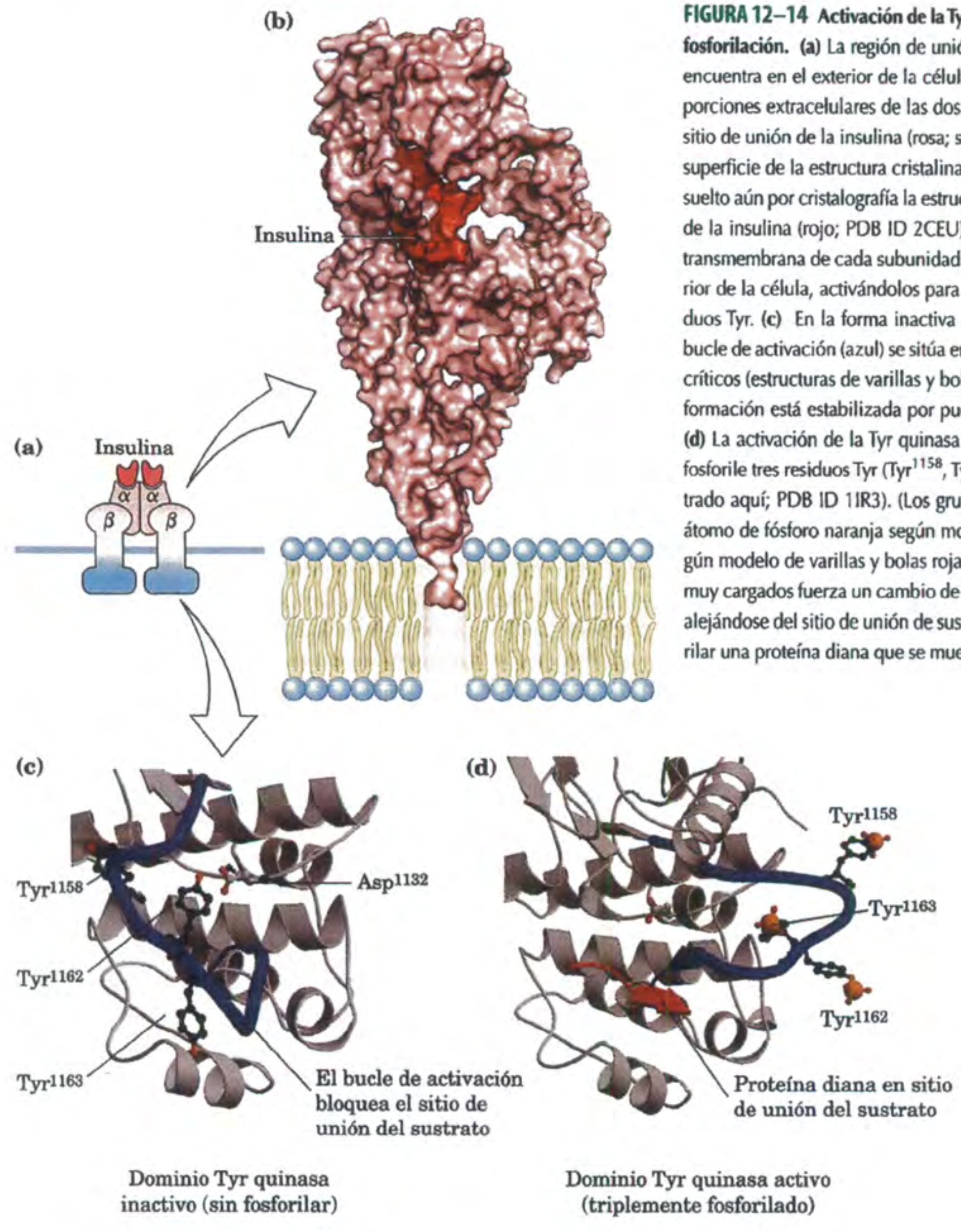


FIGURA 12–14 Activación de la Tyr quinasa del receptor de insulina por autofosforilación. **(a)** La región de unión de la insulina del receptor de insulina se encuentra en el exterior de la célula y comprende **(b)** dos subunidades α y las porciones extracelulares de las dos subunidades β entrelazadas para formar el sitio de unión de la insulina (rosa; se muestra como un modelo de contorno de superficie de la estructura cristalina, obtenida de PDB ID 2DTG). (No se ha resuelto aún por cristalografía la estructura del dominio transmembrana.) La unión de la insulina (rojo; PDB ID 2CEU) se comunica a través de la hélice sencilla transmembrana de cada subunidad β a los dos dominios Tyr quinasa en el interior de la célula, activándolos para que se fosforilen el uno al otro en tres residuos Tyr. **(c)** En la forma inactiva del dominio Tyr quinasa (PDB ID 1IRK), el bucle de activación (azul) se sitúa en el sitio activo y ninguno de los residuos Tyr críticos (estructuras de varillas y bolas negras y rojas) está fosforilado. Esta conformación está estabilizada por puentes de hidrógeno entre Tyr^{1162} y Asp^{1132}. **(d)** La activación de la Tyr quinasa permite que cada subunidad β del dímero fosforile tres residuos Tyr (Tyr^{1158}, Tyr^{1162}, Tyr^{1163}) de la otra subunidad β (mostrado aquí; PDB ID 1IR3). (Los grupos fosforilo se muestran aquí en forma de átomo de fósforo naranja según modelo espacial y con átomos de oxígeno según modelo de varillas y bolas rojas.) La introducción de tres residuos Ⓟ–Tyr muy cargados fuerza un cambio de 30 Å en la posición del bucle de activación, alejándose del sitio de unión de sustrato, que queda asequible para unir y fosforilar una proteína diana que se muestra aquí en forma de flecha roja.

do Sos se une a Grb2, Sos actúa como factor de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF), catalizando la sustitución del GDP unido por GTP en Ras, una proteína G de la familia de las que unen nucleótidos de guanosina.

Ras es el prototipo de una familia de **proteínas G pequeñas** que intervienen en una amplia variedad de transducciones de señal (véase el Recuadro 12–2). Al igual que la proteína G trimérica que funciona con el sistema β-adrenérgico (Fig. 12–5), Ras puede existir en la conformación con GTP unido (activa) o con GDP unido (inactiva); sin embargo, Ras (~20 kDa) actúa en forma monomérica. Cuando se une GTP, Ras puede activar una proteína quinasa, Raf-1 (Fig. 12-15, paso ④), la primera de tres proteína quinasas (Raf-1, MEK y ERK) que forman una cascada en la que cada quinasa activa la siguiente por fosforilación (paso ⑤). Las proteína quinasas MEK y ERK se activan por fosforilación de un residuo Thr y otro Tyr. Cuando se activa, ERK interviene en algunos de los efectos biológicos de la insulina al entrar en el núcleo y fosforilar factores de transcripción tales como Elk1 (paso ⑥), que modula la transcripción de unos 100 genes regulados por insulina (paso ⑦).

Las proteínas Raf-1, MEK y ERK son miembros de tres grandes familias, para las que se utilizan varias nomenclaturas. ERK es un miembro de la familia **MAPK** (proteínas quinasa activadas por mitógeno; los mitógenos son señales extracelulares que actúan induciendo la mitosis y la división celular). Poco después del descubrimiento de la primera MAPK, se encontró que este enzima era activado por otra proteína quinasa, a la que se denominó MAP quinasa quinasa (MEK pertenece a esta familia); cuando se descubrió una tercera quinasa que activaba la MAP quinasa quinasa se le dio el nombre más bien ridículo de MAP quinasa quinasa quinasa (Raf-1 es un miembro de esta familia; Fig. 12–15, paso ④). Ligeramente menos molestos son los acrónimos de estas tres familias, MAPK, MAPKK, MAPKKK. Las quinasas de las familias MAPK y MAPKKK son específicas para residuos Ser o

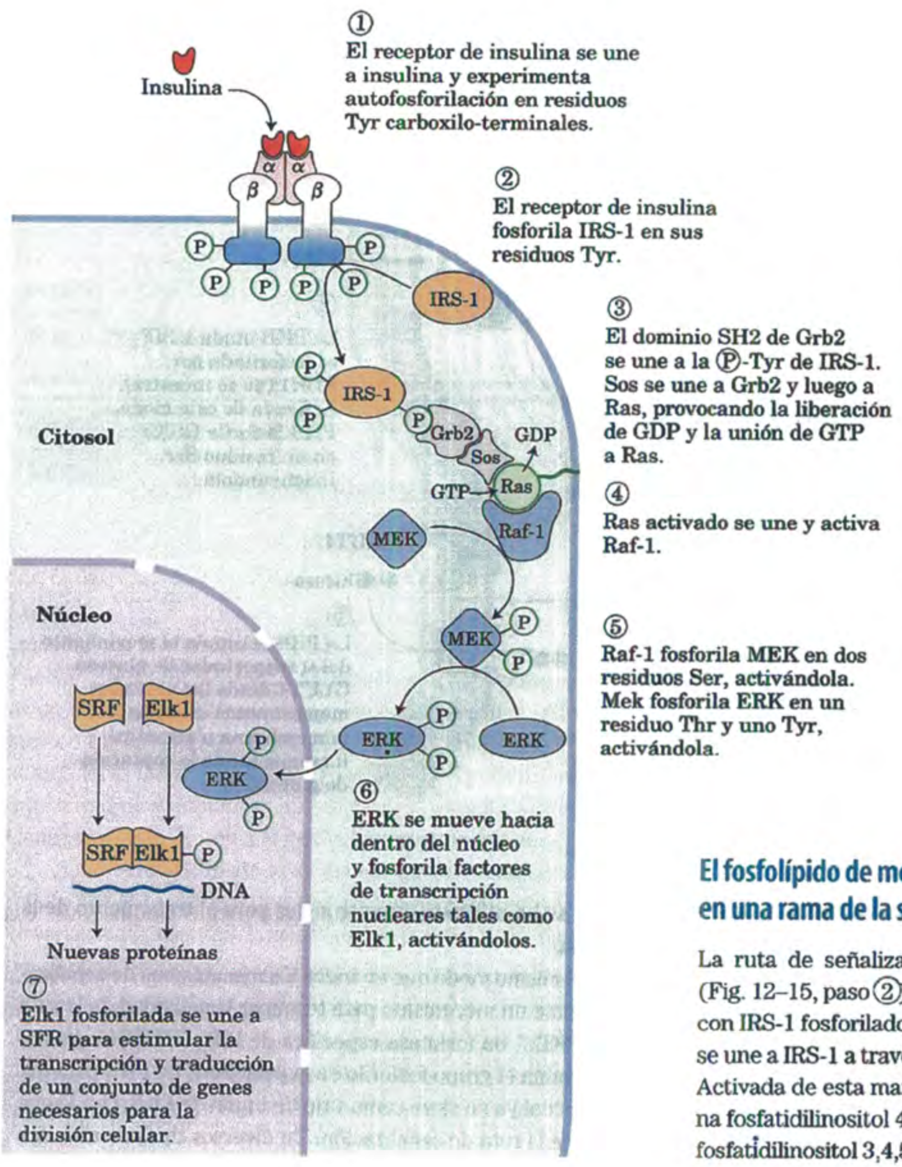


FIGURA 12–15 Regulación de la expresión génica por insulina a través de una cascada MAP quinasa. El receptor de insulina (INS-R) consiste en dos subunidades α en la cara externa de la membrana plasmática y dos subunidades β que atraviesan la membrana y sobresalen de la cara citosólica. La unión de insulina a las subunidades α provoca un cambio de conformación que permite la autofosforilación de residuos Tyr en el dominio carboxilo-terminal de las subunidades β. La autofosforilación activa además el dominio Tyr quinasa, que cataliza entonces la fosforilación de otras proteínas diana. La vía de señalización por la que la insulina regula la expresión de genes específicos consiste en una cascada de proteína quinasas, cada una de las cuales activa la siguiente. INS-R es una Tyr quinasa específica; las otras quinasas (todas ellas mostradas en azul) fosforilan residuos Ser o Thr. MEK es una quinasa de especificidad doble, que fosforila tanto residuos Thr como Tyr en ERK (extracelluar regulated kinase, quinasa regulada extracelularmente); MEK es una quinasa activadora de ERK activada por mitógeno; SRF es el factor de respuesta sérico.

Thr, mientras que las MAPKK (aquí, MEK) fosforilan un residuo Ser y otro Tyr de su sustrato, una MAPK (aquí, ERK).

Los bioquímicos reconocen ahora la vía de la insulina como un ejemplo de un tema más general en el que las señales hormonales, a través de vías similares a la que se muestra en la Figura 12–15, provocan la fosforilación de enzimas diana por proteínas quinasas. La diana de fosforilación es a menudo otra proteína quinasa, que fosforila entonces una tercera proteína quinasa, y así sucesivamente. El resultado es una cascada de reacciones que amplifica la señal inicial en muchos órdenes de magnitud (véase la Fig. 12–1b). Las **cascadas MAPK** (Figura 12–15) intervienen en la señalización iniciada por diversos factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Otro esquema general, representado por la ruta del receptor de insulina, es la utilización de proteínas adaptadoras no enzimáticas para poner en contacto los componentes de una ruta de señalización ramificada, que ahora comentaremos.

El fosfolípido de membrana PIP_3 funciona en una rama de la señalización de la insulina

La ruta de señalización de la insulina se ramifica en IRS-1 (Fig. 12–15, paso ②). Grb2 no es la única proteína que se asocia con IRS-1 fosforilado. El enzima fosfoinositol 3-quinasa (PI-3K) se une a IRS-1 a través del dominio SH2 de PI-3K **(Fig. 12–16)**. Activada de esta manera, PI-3K convierte el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2; véase la Fig. 10–16) en fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3). El grupo de cabeza con múltiples cargas del PIP_3, que sobresale en el lado citoplasmático de la membrana plasmática, es el punto de unión de una segunda rama de señalización en la que interviene otra cascada de proteína quinasas. Cuando está unida a PIP_3, la proteína quinasa B (PKB; también llamada Akt) es fosforilada y activada todavía por otra proteína quinasa, PDK1. La PKB activada fosforila entonces residuos Ser o Thr de sus proteínas diana, una de las cuales es la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). En su forma activa no fosforilada, GSK3 fosforila la glucógeno sintasa, inactivándola y contribuyendo de este modo a la disminución de la síntesis de glucógeno. (Este mecanismo es sólo una parte de la explicación de los efectos de la insulina sobre el metabolismo del glucógeno.) Cuando es fosforilada por PKB, la GSK3 se inactiva. Al impedir de esta manera la inactivación de la glucógeno sintasa en hígado y músculo, la cascada de fosforilaciones de proteínas iniciada por la insulina estimula la síntesis de glucógeno (Fig. 12–16). En una tercera vía de señalización en el músculo y en el tejido adiposo, la PKB provoca el movimiento de los transportadores de glucosa (GLUT4) desde vesículas internas a la membrana plasmática, estimulando la captación de glucosa desde la sangre (Fig. 12–16 paso ⑤; véase también el Recuadro 11–2).

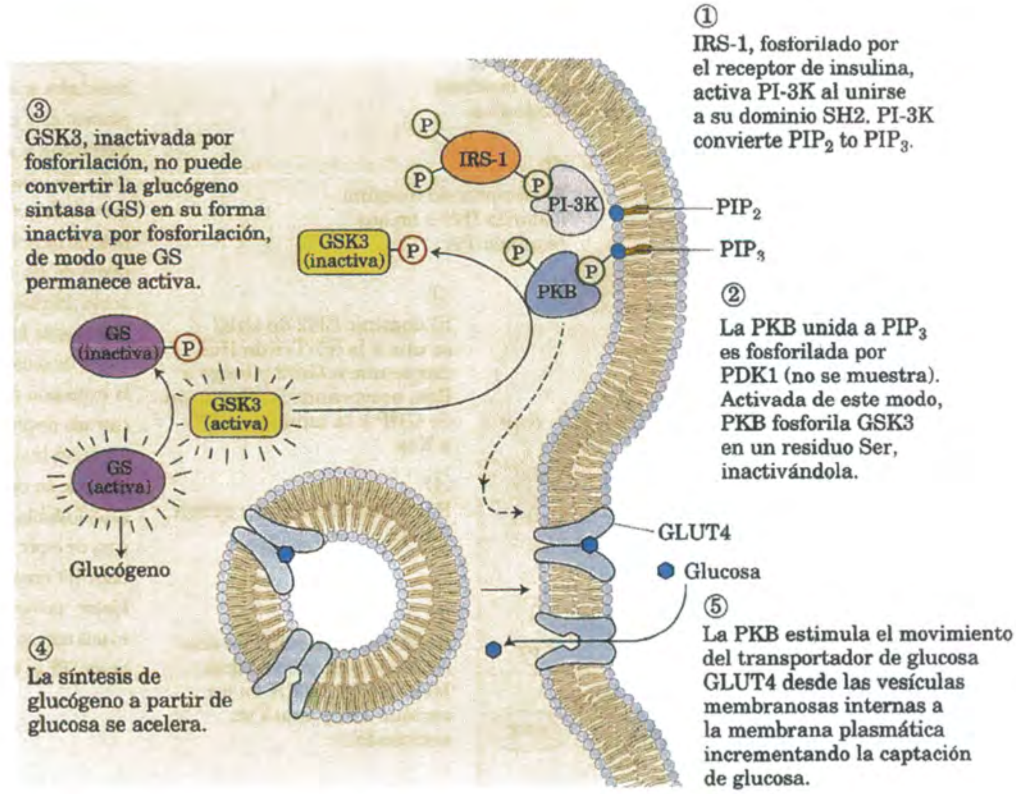
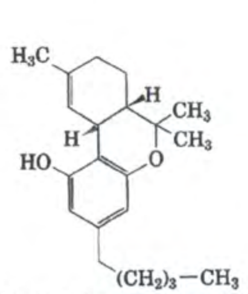
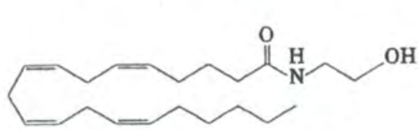


FIGURA 12–16 Activación de la glucógeno sintasa por la insulina. En la transmisión de la señal interviene la PI-3 quinasa (PI-3K) y la proteína quinasa B (PKB).

La proteína quinasa B funciona en otras vías de señalización, entre las que se cuenta la que es desencadenada por el Δ^9-tetrahidrocannabinol (THC), el ingrediente activo de la marihuana y hashish. El THC activa el receptor CB_1 de la membrana plasmática en el cerebro y pone en marcha una cascada de señalización en la que intervienen varias MAPK. Una consecuencia de la activación de CB_1 es la estimulación del apetito, uno de los efectos bien establecidos del uso de la marihuana. Los ligandos normales del receptor CB_1 son endocannabinoides tales como la anandamida, que actúa como protector del cerebro contra la toxicidad de la actividad neuronal excesiva, tal como sucede, por ejemplo, en un ataque epiléptico. El hashish se ha utilizado durante siglos para el tratamiento de la epilepsia.



Δ^9-Tetrahidrocannabinol (THC)



Anandamida (araquidoniletanolamida, un cannabinoide endógeno)

Del mismo modo que en todos los mecanismos de señalización, existe un mecanismo para terminar la actividad de la ruta PI-3K-PKB. Una fosfatasa específica de PIP_3 (PTEN en humanos) elimina el grupo fosforilo en la posición 3 de PIP_3 para dar PIP_2, el cual ya no sirve como sitio de unión de PKB, con lo que se trunca la ruta de señalización. En diversos tipos de cáncer a menudo se observa que el gen PTEN ha experimentado mutación. fenómeno que da lugar a un circuito de regulación defectuoso y concentraciones anormalmente elevadas de PIP_3 y de actividad PKB. El resultado parece ser una señal continua para la división celular y, en consecuencia, el característico crecimiento tumoral. ■

Además de los muchos receptores que actúan como proteína Tyr quinasas (las RTK), varias proteínas de membrana plasmática semejantes a receptores tienen actividad proteína Tyr fosfatasa. Basándonos en la estructura de estas proteínas, podemos suponer que sus ligandos son componentes de la matriz extracelular o de las moléculas de la superficie de otras células. Aunque sus papeles en la señalización no están todavía tan bien comprendidos como los de las RTK, poseen claramente el potencial para invertir las acciones de las señales que estimulan las RTK.

El receptor de insulina es el prototipo de una serie de enzimas receptores que tienen una estructura similar y actividad RTK **(Fig. 12–17)**. Los receptores del EGF y del PDGF, por ejemplo, presentan similitud estructural y de secuencia con el INS-R, y ambos tienen una actividad proteína Tyr quinasa que fosforila IRS-1. Muchos de estos receptores dimerizan a conti-

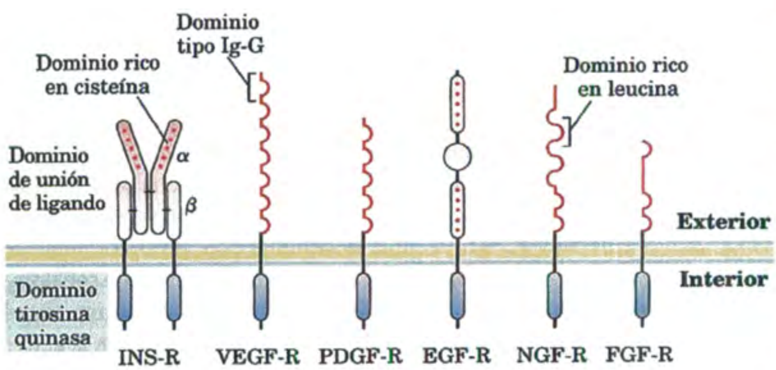


FIGURA 12–17 Tirosina quinasas de receptor. Entre los receptores de factores de crecimiento que señalizan a través de actividad Tyr quinasa se encuentran los de la insulina (INS-R), el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF-R), el factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF-R), el factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), el factor de crecimiento nervioso (NGF-R) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-R). Todos estos receptores tienen un dominio Tyr quinasa en el lado citoplasmático de la membrana plasmática (azul). El dominio extracelular es diferente para cada tipo de receptor, lo que refleja las diferentes especificidades de los factores de crecimiento. Estos dominios extracelulares son, típicamente, combinaciones de motivos estructurales tales como segmentos ricos en cisteína o leucina y segmentos que contienen uno de entre los diversos motivos comunes en las inmunoglobulinas (dominios tipo Ig; véase la p. 137). En el genoma humano están codificados muchos otros receptores de este tipo, cada uno de ellos con un dominio extracelular diferente.

nuación de la unión de ligando; INS-R es la excepción, pues ya es un dímero $(\alpha\beta)_2$ antes de que se una la insulina. (El protómero de la insulina es la unidad $\alpha\beta$.) La unión de proteínas adaptadoras tales como Grb2 a residuos Ⓟ–Tyr es un mecanismo común para promover interacciones proteína-proteína iniciadas por las RTK, tema al que volveremos en la Sección 12.5.

¿Qué es lo que incitó la evolución de tan complejo sistema regulador? Este sistema permite que un receptor activado active varias moléculas IRS-1, amplificando la señal de la insulina, al tiempo que proporciona medios para la integración de señales de varios receptores, tales como EGF-R y PDGF-R, cada uno de los cuales puede fosforilar IRS-1. Además, debido a que IRS-1 puede activar cualquiera de las diversas proteínas que contienen dominios SH2, un único receptor actuando a través de IRS-1 puede poner en marcha dos o más vías de señalización; la insulina afecta la expresión génica a través de la vía Grb2-Sos-Ras-MAPK y al metabolismo del glucógeno y transporte de glucosa a través de la vía PI-3K–PKB. Finalmente, existen varias proteínas estrechamente relacionadas con IRS (IRS-2, IRS-3), cada una con una distribución y una función tisular característica, que todavía enriquece más las posibilidades de señalización de las rutas iniciadas por las RTK.

En el sistema de señalización JAK-STAT también interviene la actividad tirosina quinasa

Una variación sobre el tema básico de Tyr quinasas de receptor son los receptores que no tienen actividad proteína quinasa intrínseca pero que cuando están ocupados por su ligando unen una Tyr quinasa *citosólica*. Un ejemplo de ello es el sistema que regula la formación de eritrocitos en mamíferos. La señal de desarrollo o **citoquina** de este sistema es la eritropoyetina (EPO), una proteína de 165 aminoácidos sintetizada en el riñón. Cuando la EPO se une a su receptor de la membrana plasmática **(Fig. 12–18)**, el receptor se dimeriza y puede ahora unir la proteína quinasa soluble JAK (*Ja*nus *k*inase). La JAK activada fosforila varios residuos Tyr del dominio citoplasmático del receptor de EPO. También son diana de la actividad JAK quina-

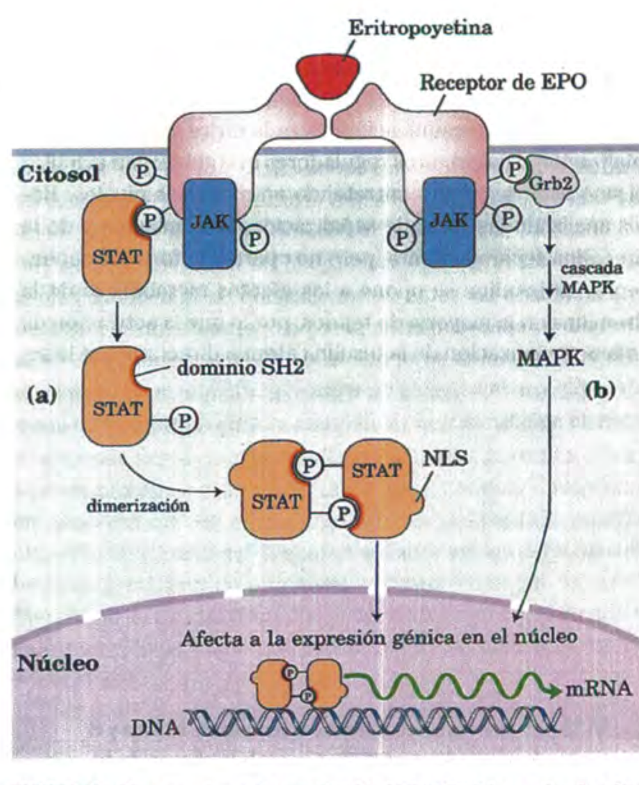


FIGURA 12–18 Mecanismo de transducción JAK-STAT del receptor de eritropoyetina. La unión de eritropoyetina (EPO) provoca la dimerización del receptor de EPO que permite que JAK, una Tyr quinasa soluble, se una al dominio interno del receptor y lo fosforile en diversos residuos Tyr. **(a)** En una ruta de señalización, el dominio SH2 de la proteína STAT5 del grupo de proteínas STAT se une a residuos Ⓟ–Tyr del receptor, poniéndolo en la proximidad de JAK. La fosforilación de STAT5 por JAK permite que dos moléculas de STAT5 dimericen, cada una por unión al residuo Ⓟ–Tyr de la otra, exponiendo de esta manera una secuencia de localización nuclear (NLS) que dirige el dímero para su transporte al núcleo. En el núcleo STAT5 provoca la expresión de genes controlada por EPO. **(b)** En una segunda ruta de señalización, después de la unión de EPO y la autofosforilación de JAK, la proteína adaptadora Grb2 se une a Ⓟ–Tyr de JAK y desencadena la cascada MAPK, al igual que en el sistema de la insulina (véase la Fig. 12-15).

sa, una familia de factores de transcripción, conocidos colectivamente como STAT (*s*ignal *t*ransducers and *a*ctivators of *t*ranscription; transductores de señal y activadores de la transcripción). Un dominio SH2 en STAT5 une residuos Ⓟ–Tyr en el receptor de EPO, posicionando el STAT para su fosforilación por JAK en respuesta a EPO. El STAT5 fosforilado forma dímeros que exponen una señal que provoca de su transporte hasta el núcleo. Allí, STAT5 induce la expresión (transcripción) de genes específicos esenciales para la maduración de los eritrocitos. Este sistema JAK-STAT también opera en otras rutas de señalización, entre las que se cuenta la de la hormona leptina, descrita en detalle en el Capítulo 23 (véase la Fig. 23-37). La JAK activada también puede poner en marcha la cascada MAPK a través de Grb2 (Fig. 12–18b), que conduce a la expresión alterada de genes específicos.

Src es otra proteína Tyr quinasa soluble que se asocia con ciertos receptores cuando unen sus ligandos. Src fue la primera proteína en la que se encontró el dominio de unión de Ⓟ–Tyr característico y que posteriormente se denominó dominio de homología Src (SH2).

La comunicación cruzada entre sistemas de señalización es frecuente y compleja

Aunque en aras de la simplicidad hemos tratado rutas de señalización individuales como secuencias de acontecimientos que conducen a consecuencias metabólicas diferentes, de hecho hay una extensa comunicación cruzada entre los sistemas de señalización. Los circuitos reguladores que gobiernan el metabolismo está ricamente entretejido en múltiples niveles. Hemos analizado las rutas de señalización de la insulina y de la adrenalina separadamente, pero no operan de forma independiente. La insulina se opone a los efectos metabólicos de la adrenalina en la mayoría de tejidos, por lo que la activación de la vía de señalización de la insulina atenúa directamente la señalización a través del sistema de señalización β-adrenérgico. Por ejemplo, la INS-R quinasa fosforila directamente dos residuos Tyr en la cola citoplasmática de un receptor β_2-adrenérgico, y la PKB, activada por la insulina **(Fig. 12–19)**, fosforila dos residuos Ser en la misma región. La fosforilación de estos cuatro residuos provoca la internalización del receptor β-adrenérgico, dejándolo inactivo y disminuyendo la sensibilidad de la célula a la adrenalina. Un segundo tipo de comunicación cruzada que se da entre estos receptores es la que tiene lugar cuando residuos Ⓟ–Tyr en el receptor β_2-adrenérgico, fosforilado por INS-R, actúan como puntos de nucleación para las proteínas que contienen el dominio SH2 tales como Grb2 (Fig. 12–19, lado izquierdo). La activación de la MAPK ERK por la insulina (véase la Fig. 12–15) es de 5 a 10 veces superior en presencia del receptor β_2-adrenérgico, probablemente a causa de esta comunicación cruzada. Los sistemas de señalización que utilizan cAMP y Ca^{2+} también muestran una interacción importante; cada segundo mensajero afecta a la generación y concentración del otro. Uno de los retos principales de la biología de sistemas es discernir los efectos de tales interacciones sobre los patrones metabólicos generales de cada tejido: ¡una tarea desalentadora!

RESUMEN 12.3 Receptores tirosina quinasas

- El receptor de insulina, INS-R, es el prototipo de enzimas receptores con actividad Tyr quinasa. Cuando se une la insulina, cada unidad $\alpha\beta$ de INS-R fosforila la subunidad β de su pareja, activando la actividad Tyr quinasa del receptor. La quinasa cataliza la fosforilación de residuos Tyr sobre otras proteínas tales como IRS-1.
- Los residuos fosfotirosina en IRS-1 actúan como sitios de unión para proteínas con dominios SH2. Algunas de estas

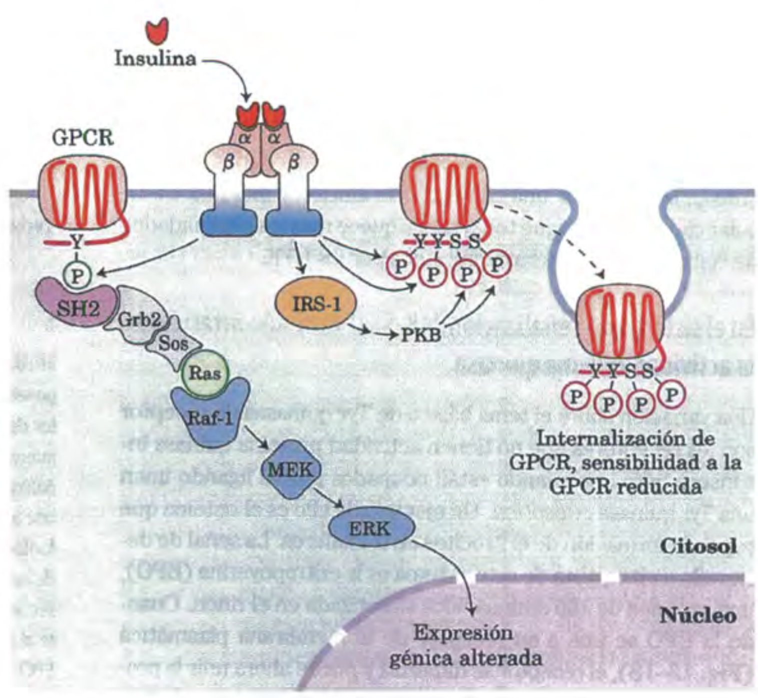


FIGURA 12–19 Intercomunicación entre el receptor de insulina y el receptor β_2-adrenérgico (u otro GPCR). Cuando la insulina unida activa INS-R, su Tyr quinasa fosforila directamente el receptor β_2-adrenérgico (lado derecho) en dos residuos Tyr (Tyr^{350} y Tyr^{364}) cerca de su carboxilo terminal e indirectamente (mediante la activación de la proteína quinasa B (PKB); véase la Fig. 12–16) produce la fosforilación de dos residuos Ser en la misma región. El efecto de estas fosforilaciones es la internalización del receptor adrenérgico, reduciendo la respuesta al estímulo adrenérgico. De forma alternativa (lado izquierdo) la fosforilación catalizada por INS-R de una GPCR (un receptor adrenérgico o de otro tipo) en una Tyr del carboxilo terminal crea el punto de nucleación para activar la cascada MAPK (véase la Fig. 12–15) en la que Grb2 sirve de proteína adaptadora. En este caso, INS-R ha utilizado el GPCR para aumentar su propia señal.

proteínas, como Grb2, tienen dos o más dominios de unión de proteínas y pueden actuar como adaptadores que acercan las proteínas a posiciones muy próximas.

- Sos unida a Grb2 cataliza el intercambio GDP-GTP en Ras (una proteína G pequeña) que, a su vez, activa una cascada MAPK que finaliza con la fosforilación de proteínas diana en el citosol y en el núcleo. El resultado son cambios específicos y alteración de la expresión génica.
- El enzima PI-3K, activado por interacción con IRS-1, transforma el lípido de membrana PIP_2 en PIP_3, que se convierte en el punto de nucleación para proteínas en una segunda y tercera ramas de la señalización por insulina.
- En el sistema de señalización JAK-STAT, una proteína Tyr quinasa soluble (JAK) se activa por asociación con un receptor y a continuación fosforila el factor de transcripción STAT, que entra en el núcleo y altera la expresión de un conjunto de genes.
- Hay amplias interconexiones entre las rutas de señalización, que permiten la integración y la regulación fina de múltiples efecos hormonales.

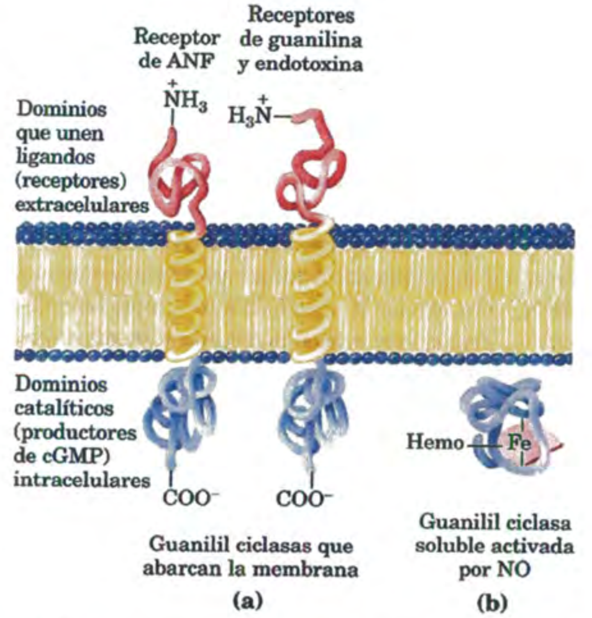
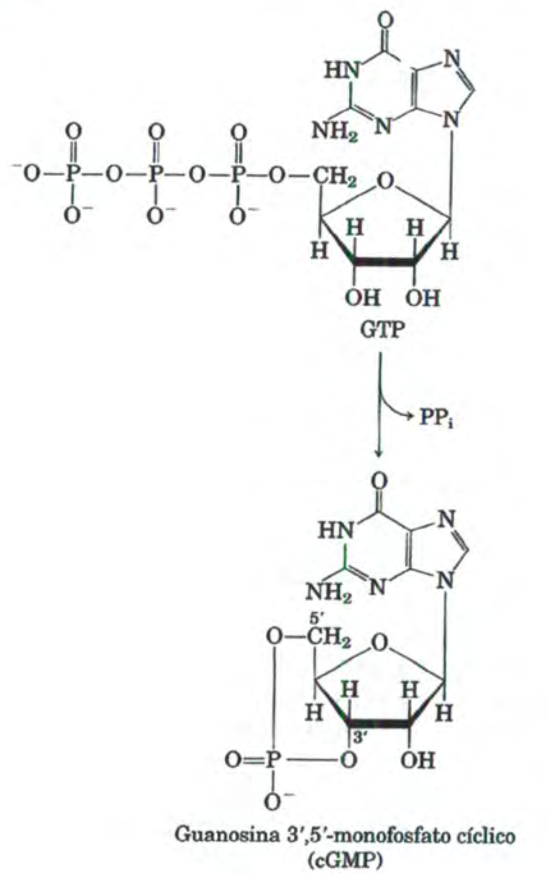


FIGURA 12–20 Dos isozimas de guanilil ciclasa que participan en la tranducción de señales. (a) Un isozima existe en dos formas similares que abarcan la membrana y que son activadas por sus ligandos extracelulares: factor natriurético auricular (ANF; receptores en células de los conductos renales colectores y del músculo liso de los vasos sanguíneos) y guanilina (receptores en las células del epitelio intestinal). El receptor de guanilina es también la diana de una endotoxina bacteriana que desencadena diarrea grave. **(b)** El otro isozima es un enzima soluble que contiene hemo y que se activa por óxido nítrico intracelular (NO); esta forma se encuentra en muchos tejidos, entre ellos el músculo liso del corazón y de los vasos sanguíneos.

12.4 Receptores guanilil ciclasas, cGMP y proteína quinasa G

Las guanilil ciclasas **(Fig. 12–20)** son receptores enzimáticos que cuando se activan convierten el GTP en el segundo mensajero **guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico (GMP cíclico** o **cGMP):**



Guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cGMP)

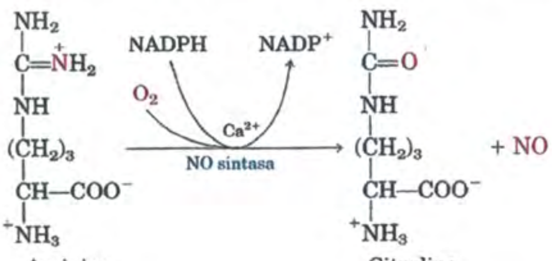
Muchas de las acciones del cGMP en animales se realizan mediante la **proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG).** Al activarse por acción del cGMP, la PKG fosforila residuos Ser y Thr en proteínas diana. Los dominios catalítico y regulador de este enzima se encuentran en un polipéptido sencillo (M_r ~80.000). Parte del dominio regulador encaja cómodamente en la hendidura de unión del sustrato. La unión de cGMP fuerza este pseudosustrato fuera del sitio de unión, abriendo el sitio a proteínas diana que contienen la secuencia consenso para la PKG.

El GMP cíclico transporta mensajes diferentes en tejidos diferentes. En el riñón y en el intestino desencadena cambios en el transporte iónico y en la retención de agua; en el músculo cardíaco (un tipo de músculo liso) señala relajación; en el cerebro puede estar relacionado tanto con el desarrollo como con el funcionamiento del cerebro adulto. La guanilil ciclasa del riñón se activa por la hormona peptídica **factor natriurético auricular (ANF),** liberada por las células de la aurícula del corazón cuando éste se ensancha por un incremento del volumen sanguíneo. Transportado por la sangre al riñón, el ANF activa la guanilil ciclasa de las células de los conductos colectores (Fig. 12–20a). El incremento resultante de la [cGMP] provoca un aumento de la excreción renal de Na^+ y, por consiguiente, de agua como consecuencia de cambio de presión osmótica. La pérdida de agua reduce el volumen sanguíneo, contrarrestando el estímulo que inicialmente llevó a la secreción de ANF. El

músculo liso vascular tiene también un receptor guanilil ciclasa de ANF; al unirse a este receptor, el ANF provoca la relajación (vasodilatación) de los vasos sanguíneos, que aumenta el flujo sanguíneo y, por tanto, reduce la presión sanguínea.

Un receptor guanilil ciclasa similar de la membrana plasmática de las células epiteliales que recubren el intestino se activa por el péptido **guanilina** (Fig. 12–20a), que regula la secreción de Cl^- en el intestino. Este receptor es también la diana de una endotoxina peptídica termoestable producida por *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas. El incremento en la [cGMP] provocado por la endotoxina incrementa la secreción de Cl^- y, como consecuencia, decrece la reabsorción de agua por el epitelio intestinal, provocando diarrea.

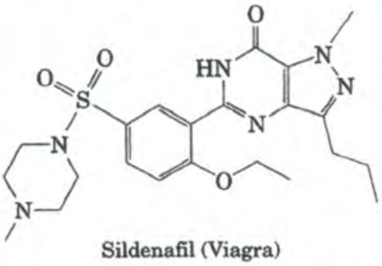
Un tipo inconfundiblemente diferente de guanilil ciclasa es una proteína citosólica con un grupo hemo unido fuertemente (Fig. 12–20b). Este enzima se activa por óxido nítrico (NO). El óxido nítrico se produce a partir de arginina por una **NO sintasa** dependiente de Ca^{2+}, presente en muchos tejidos de mamíferos, y difunde desde su célula de origen hasta las células vecinas.



El NO es suficientemente apolar para cruzar las membranas plasmáticas sin un transportador. En la célula diana se une al grupo hemo de la guanilil ciclasa y activa la producción de cGMP. En el corazón, el cGMP ocasiona contracciones menos enérgicas al estimular la bomba (o bombas) de iones que expulsan Ca^{2+} del citosol.

Esta relajación inducida por NO del músculo cardíaco es la misma respuesta que ocasionan la nitroglicerina y otros nitrovasodilatadores que se toman para aliviar la **angina de pecho,** el dolor provocado por la contracción de un corazón privado de O_2 debido a arterias coronarias bloqueadas. El óxido nítrico es inestable y su acción es breve; segundos después de su formación, sufre una oxidación a nitrito o nitrato. Los nitrovasodilatadores producen una relajación duradera del músculo cardíaco, ya que tardan varias horas para degradarse, produciendo una corriente continua de NO. El valor de la nitroglicerina como tratamiento para la angina de pecho se describió de manera inesperada en fábricas que producían nitroglicerina como explosivo en la década de 1860. Los trabajadores que sufrían angina declararon que su situación mejoraba mucho durante la semana laboral pero que empeoraba los fines de semana. Los médicos que trataban a estos trabajadores oían esta historia con tanta frecuencia que realizaron la conexión, con lo que nació el medicamento.

Los efectos de la síntesis aumentada de cGMP disminuyen cuando cesa el estímulo, debido a que una fosfodiesterasa específica (cGMP PDE) convierte el cGMP en 5′-GMP inactivo. Los humanos poseen diversas isoformas de cGMP PDE con diferentes distribuciones tisulares. La isoforma de los vasos sanguíneos del pene es inhibida por el fármaco sildenafil (Viagra) que, por consiguiente, permite que la [cGMP] permanezca elevada una vez ha aumentado por el estímulo adecuado, lo que explica la utilidad de este medicamento en el tratamiento de la disfunción eréctil. ■



Sildenafil (Viagra)

El GMP cíclico tiene otro modo de acción en el ojo de los vertebrados: provoca la apertura de canales específicos de iones en los bastones y conos de la retina. Volveremos a este papel del cGMP en la discusión sobre la visión en la Sección 12.10.

RESUMEN 12.4 Receptores guanilil ciclasas, cGMP y proteína quinasa G

- Varias señales, entre ellas el factor natriurético auricular y la guanilina, actúan a través de receptores enzimáticos con actividad guanilil ciclasa. El cGMP así producido es un segundo mensajero que activa la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG). Este enzima altera el metabolismo al fosforilar enzimas diana específicos.
- El óxido nítrico es un mensajero de vida corta que estimula una guanilil ciclasa soluble, aumentando [cGMP] y estimulando la PKG.

12.5 Proteínas adaptadoras polivalentes y balsas de membrana

De los estudios de los sistemas de señalización han emergido dos generalizaciones tales como las discutidas hasta el momento: (1) proteína quinasas que fosforilan residuos Tyr, Ser y Thr son cruciales en la señalización, y (2) interacciones proteína-proteína reversibles producidas por la fosforilación reversible de residuos Tyr, Ser y Thr en las proteínas de señalización crean *sitios de anclaje* para otras proteínas. De hecho, muchas proteínas de señalización son *polivalentes* en el sentido que pueden interaccionar con varias proteínas simultáneamente para formar complejos de señalización multiproteicos. En esta sección se presentan unos cuantos ejemplos para ilustrar los principios generales de las interacciones proteicas dependientes de fosforilación en las vías de señalización.

Módulos proteicos unen residuos Tyr, Ser o Thr fosforilados de proteínas asociadas

Hemos visto que la proteína Grb2 de la ruta de señalización de la insulina (Figs. 12–15 y 12–19) se une a través de su dominio SH2 a otras proteínas que contienen residuos Ⓟ–Tyr expuestos. El genoma humano codifica al menos 87 proteínas que contienen SH2, muchas de las cuales ya se sabe que participan en señalización. El residuo Ⓟ–Tyr está unido en una bolsa profunda de un dominio SH2 y en el que todos los oxígenos del fosfato

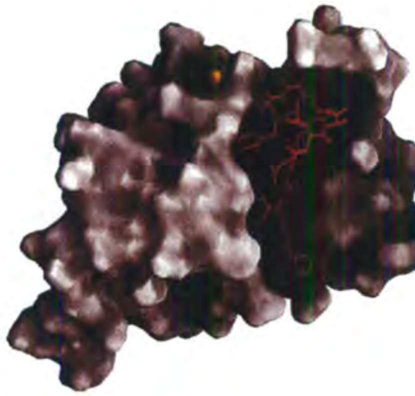


FIGURA 12–21 Interacción de un dominio SH2 con un residuo Ⓟ–Tyr en una proteína asociada. (PDB ID 1SHC) El dominio SH2 se muestra en gris en una representación de contorno de superficie. El fósforo del grupo fosfato en la Ⓟ–Tyr que interactúa es visible en forma de esfera naranja; la mayor parte del residuo Tyr está oscurecida en esta vista. Los siguientes residuos en dirección al extremo carboxilo de la proteína asociada se muestran en rojo. El dominio SH2 interacciona normalmente con una Ⓟ–Tyr (a la que se le asigna la posición de índice 0) y con los tres siguientes residuos hacia el extremo carboxilo (designados 11, 12, 13). Los residuos importantes en la interacción con Ⓟ—Tyr están conservados en todos los dominios SH2. Algunos dominios SH2 (Src, Fyn, Hck, Nck), favorecen la presencia de residuos cargados negativamente en las posiciones 11 y 12; otros (PLC-g1, SHP-2) tienen un surco hidrofóbico largo que une residuos alifáticos en las posiciones 11 a 15. Estas diferencias definen subclases de dominios SH2 que tienen diferentes especificidades de proteínas asociadas.

participan en interacciones por puentes de hidrógeno o electrostáticas; en la fijación tienen un papel prominente las cargas positivas de dos residuos Arg. La especificidad de las interacciones entre diferentes proteínas que contienen SH2 con las diversas proteínas que contienen Ⓟ–Tyr se explican por diferencias sutiles en la estructura de sus dominios SH2. Los tres a cinco residuos en el lado carboxilo terminal del residuo Ⓟ–Tyr son críticos para determinar la especificidad de estas interacciones **(Fig. 12–21)**.

Los dominios fijadores de fosfotirosina (**dominios PTB;** phosphotyrosine-binding domains) también unen Ⓟ–Tyr en proteínas asociadas, pero se distinguen de los dominios SH2 por sus secuencias y estructuras tridimensionales críticas. El genoma humano codifica 24 proteínas que contienen dominios PTB, incluida IRS-1, que ya hemos encontrado en su papel como proteína adaptadora en la transducción de la señal de la insulina (Fig. 12–15). Los sitios de unión Ⓟ–Tyr para los dominios SH2 y PTB en proteínas asociadas se crean mediante Tyr quinasas y se eliminan por fosfoproteína fosfatasas (PTPasas).

Otras proteína quinasas de señalización, entre ellas PKA, PKC, PKG y miembros de la cascada MAPK, fosforilan residuos Ser o Thr en sus proteínas diana que, en algunos casos, adquieren la capacidad de interaccionar con proteínas asociadas a través del residuo fosforilado, poniendo en marcha un proceso secuencial. Se ha identificado toda una sopa de letras de dominios que unen residuos Ⓟ– Ser o Ⓟ–Thr, y a buen seguro que se identificarán aún más. Cada dominio favorece una cierta secuencia alrededor del residuo fosforilado, por lo que los dominios representan familias con sitios de reconocimiento altamente específicos, capaces de unirse a un subconjunto específico de proteínas fosforiladas.

Hay algunos casos en los que la región en una proteína que une Ⓟ–Tyr de una proteína sustrato está enmascarada por su interacción con una Ⓟ–Tyr en el mismo enzima. Por ejemplo, la proteína Tyr quinasa soluble Src, cuando está fosforilada en un residuo Tyr crítico, se vuelve inactiva porque un dominio SH2 necesario para fijarse a la proteína sustrato se une a un Ⓟ– Tyr interno. Cuando se hidroliza este residuo Ⓟ–Tyr por una fosfoproteína fosfatasa, se activa la actividad Tyr quinasa de Src **(Fig. 12–22a)**. De modo parecido, la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) es inactiva cuando está fosforilada en un residuo Ser de su dominio autoinhibidor (Fig. 12–22b). La desfosforilación de este dominio libera al enzima para unirse (y a continuación fosforilar) a sus proteínas diana.

Además de los tres residuos que se fosforilan normalmente en las proteínas, existe una cuarta estructura que nuclea la for-

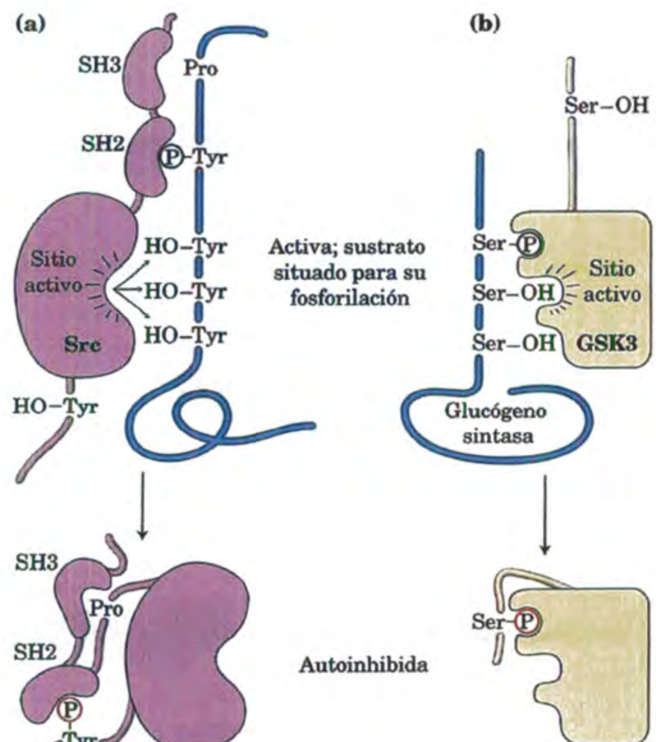


FIGURA 12–22 Mecanismo de autoinhibición de Src y GSK3. (a) En la forma activa de la Tyr quinasa Src, un dominio SH2 se une a Ⓟ–Tyr de la proteína sustrato y un dominio SH3 se une a una región rica en prolina del sustrato, recubriendo el sitio activo de la quinasa con varios residuos Tyr diana del sustrato (parte superior). Cuando se fosforila Src en un residuo Tyr específico (parte inferior), el dominio SH2 se une a la Ⓟ–Tyr interna en lugar de la Ⓟ–Tyr del sustrato, impidiendo la unión enzima-sustrato productiva; de este modo el enzima se autoinhibe. **(b)** En la forma activa de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) un dominio de unión de Ⓟ–Ser interno está disponible para unir un residuo Ⓟ–Ser en su sustrato (glucógeno sintasa), y de este modo posicionar la quinasa para que fosforile residuos Ser vecinos (parte superior). La fosforilación de un residuo Ser interno permite que este segmento interno de la quinasa ocupe el sitio de unión de Ⓟ–Ser, lo que bloquea la unión de sustrato (parte inferior).

mación de complejos supramoleculares de las proteínas de señalización: el grupo fosforilado de cabeza de los fosfatidilinositoles de la membrana. Muchas proteínas de señalización contienen dominios tales como SH3 y PH (plextrin homology domain; dominio de homología de la plextrina) que se unen fuertemente al PIP_3 que sobresale de la cara interna de la membrana plasmática. Dondequiera que el enzima PI-3K crea este grupo (tal como lo hace en respuesta a la señal de la insulina), las proteínas que se unen se congregarán en la superficie de la membrana.

La mayoría de proteínas que intervienen en la señalización en la membrana plasmática tienen uno o más dominios de fijación de proteína o fosfolípido; muchas tienen tres o más, por lo que son plurivalentes en sus interacciones con otras proteínas de señalización. En la **Figura 12–23** se muestran algunas de entre las muchas proteínas plurivalentes que se sabe que participan en la señalización. Muchos de estos complejos contienen componentes con dominios de fijación a la membrana. Dada la localización de tantos procesos de señalización en la superficie interna de la membrana plasmática, las moléculas que han de colisionar para producir la respuesta de señalización quedan confinadas de manera efectiva a un espacio bidimensional: la superficie de la membrana. Aquí las colisiones son mucho más probables que en el espacio tridimensional del citosol.

En resumen, a partir de estudios de muchas proteínas de señalización y de los múltiples dominios que contienen, ha emergido un cuadro extraordinario. Una señal inicial produce la fosforilación del receptor o de una proteína diana, desencadenando la formación de grandes complejos multiproteína, unidos sobre armazones formados por proteínas adaptadoras con capacidades de fijación plurivalentes. Algunos de estos complejos tienen diversas proteína quinasas que, a su vez, se activan secuencialmente, produciendo una cascada de fosforilación y una gran amplificación de la señal inicial. Las interacciones entre las quinasas de la cascada no se dejan al capricho de colisiones al azar en el espacio tridimensional. En la cascada MPK, por ejemplo, una familia de proteínas adaptadoras unen las tres quinasas (MAPK, MAPKK y MAPKKK), asegurando su proximidad y orientación correcta y confiriendo incluso propiedades alostéricas en las interacciones entre las quinasas, lo que hace que su fosforilación en serie sea sensible a estímulos muy pequeños.

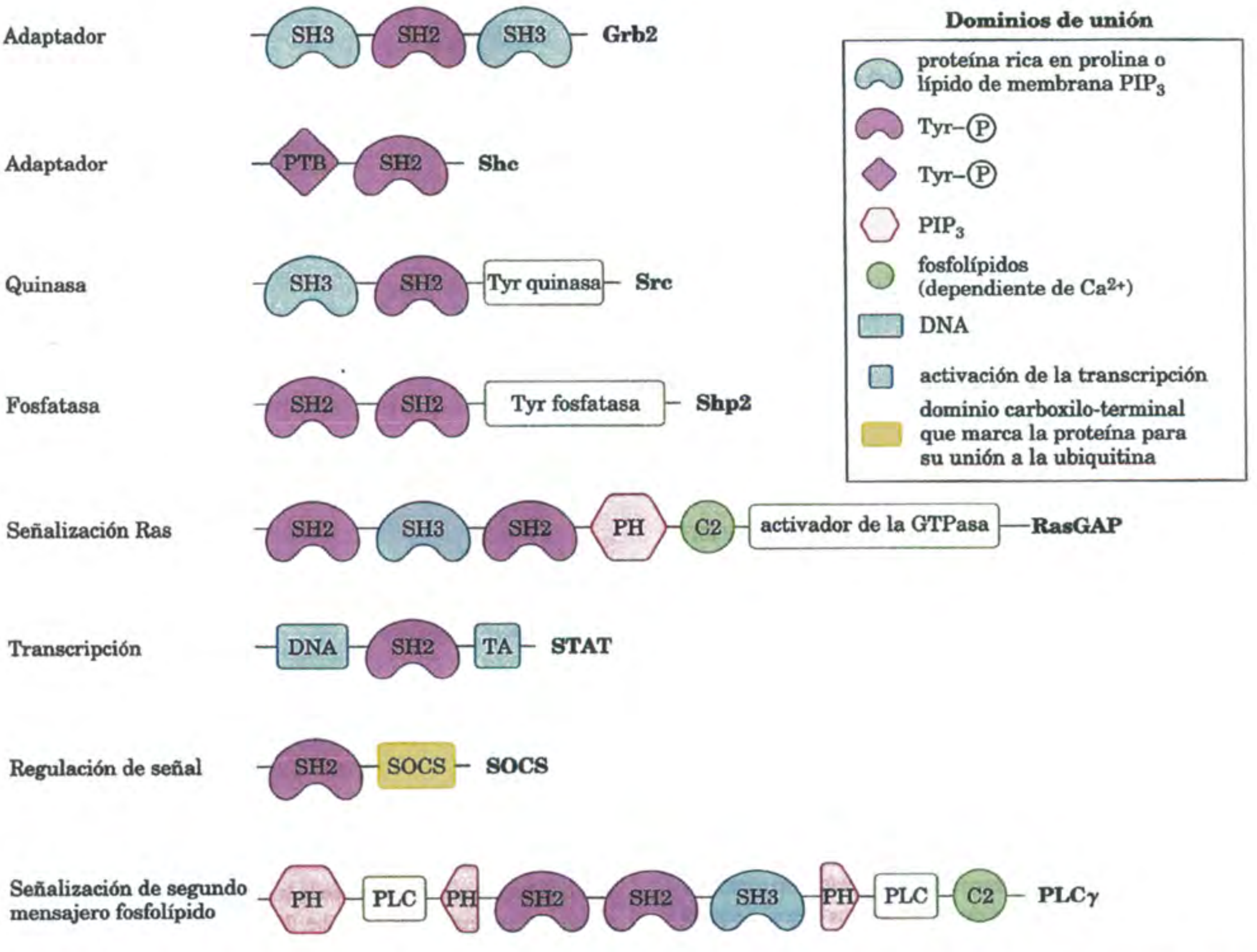


FIGURA 12–23 Algunos módulos de unión de proteínas señalizadoras. Cada proteína está representada por una línea (con el extremo amino a la izquierda); los símbolos indican la localización de dominios de unión conservados (con las especificidades que se dan en la clave; PH indica homología plextrina; otras abreviaturas se explican en el texto); los recuadros verdes indican actividades catalíticas. El nombre de cada proteína aparece en su extremo carboxilo-terminal. Estas proteínas de señalización interaccionan con proteínas fosforiladas o fosfolípidos en muchas permutaciones y combinaciones para formar complejos de señalización integrados.

Las células animales también tienen fosfotirosina fosfatasas que eliminan el fosfato de residuos Ⓟ–Tyr, invirtiendo el efecto de la fosforilación. Algunas de estas fosfatasas son proteínas de membrana tipo receptor controladas por factores extracelulares todavía sin identificar; otras PTPasas son solubles y contienen dominios SH2. Además, las células animales tienen proteína Ⓟ–Ser y Ⓟ–Thr fosfatasas que invierten los efectos de proteínas quinasas específicas de Ser y Thr. Podemos ver, por tanto, que la señalización tiene lugar en *circuitos proteicos*, estrechamente conectados desde el receptor de la señal hasta el efector de la respuesta con la capacidad de desconectarse de manera instantánea por hidrólisis de un simple enlace éster fosfato.

La plurivalencia de las proteínas de señalización permite la formación de muchas combinaciones diferentes de módulos de señalización; cada una de estas combinaciones está adaptada a señales, tipos de células y circunstancias metabólicas concretas. La gran variedad de proteína quinasas y de dominios de unión de fosfoproteínas, cada uno de ellos con su especificidad propia (la secuencia consenso requerida en su sustrato), proporciona muchos circuitos de señalización de complejidad extraordinaria.

Las balsas de membrana y las caveolas pueden segregar proteínas de señalización

Las balsas de membrana (Capítulo 11) son regiones de la bicapa de la membrana enriquecidas en esfingolípidos, esteroles y ciertas proteínas, entre ellas muchas que están unidas a la bicapa mediante anclas de GPI. El receptor β-adrenérgico está segregado en balsas que contienen proteínas G, adenilil ciclasa, PKA y una proteína fosfatasa específica, PP2, que conjuntamente constituyen una unidad de señalización altamente integrada. Al segregarse en una pequeña región de la membrana plasmática todos los elementos necesarios para responder a una señal y también finalizarla, la célula puede producir un "puff" altamente localizado y breve de segundo mensajero.

Algunas RTK (EGF-R y PDGF-R) parecen estar localizadas en balsas, por lo que este secuestro es muy probable y funcionalmente significativo. Cuando se elimina el colesterol de las balsas mediante tratamiento con ciclodextrina (que une colesterol eliminándolo), las balsas se desmoronan y las diversas rutas de señalización se vuelven defectuosas.

Si un RTK de una balsa está fosforilado al tiempo que la única PTPasa que invierte esta fosforilación se encuentra en otra balsa, la desfosforilación de la RTK será lenta o no se producirá. Las interacciones entre proteínas adaptadoras podrían ser suficientemente fuertes como para atraer hacia una balsa una proteína de señalización que, normalmente, no se localiza allí, o incluso podrían ser suficientemente fuertes como para deshacerse de receptores de una balsa. Por ejemplo, el EGF-R en fibroblastos aislados está concentrado normalmente en balsas especializadas denominadas caveolas (véase la Fig. 11–21) pero el tratamiento con EGF hace que el receptor abandone la balsa. Esta migración depende de la actividad proteína quinasa del receptor; receptores mutantes que carecen de esta actividad permanecen en las balsas durante el tratamiento con EGF. La caveolina, una proteína integral de membrana, localizada en caveolas, se fosforila en residuos Tyr en respuesta a la insulina y el ahora activado EGF-R puede atraer a sus proteínas de fijación asociadas hacia la balsa. La segregación espacial de proteínas de señalización en balsas añade una nueva dimensión a los ya complejos procesos iniciados por señales extracelulares.

RESUMEN 12.5 Proteínas adaptadoras polivalentes y balsas de membrana

- Muchas proteínas de señalización tienen dominios que unen residuos Tyr, Ser o Thr fosforilados de otras proteínas; la especificidad de unión de cada dominio viene determinada por secuencias adyacentes al residuo fosforilado en el sustrato.
- Los dominios SH2 y PTB se unen a proteínas que contienen residuos Ⓟ–Tyr; otros dominios unen residuos Ⓟ– Ser y Ⓟ–Thr en diversos contextos.
- Los dominios SH3 y PH se unen al fosfolípido de membrana PIP_3.
- Muchas proteínas de señalización son plurivalentes con varios módulos de unión diferentes. Al combinar la especificidad de sustrato de diversas proteína quinasas con la especificidad de dominios que unen residuos Ser, Thr o Tyr fosforilados y con fosfatasas que pueden inactivar rápidamente una ruta de señalización, las células crean un gran número de complejos de señalización multiproteicos.
- Las balsas de membrana y las caveolas secuestran grupos de proteínas de señalización en pequeñas regiones de la membrana plasmática, favoreciendo sus interacciones y haciendo que la señalización sea más eficiente.

12.6 Canales iónicos de compuerta

Los canales iónicos son el fundamento de la señalización eléctrica en células excitables

Ciertas células de los organismos multicelulares son "excitables": pueden detectar una señal externa, convertirla en una señal eléctrica (de modo específico, un cambio en el potencial de membrana) y transmitirla. Las células excitables tienen papeles centrales en la conducción nerviosa, en la contracción muscular, en la secreción hormonal, en los procesos sensoriales y en el aprendizaje y la memoria. La excitabilidad de las células sensoriales, las neuronas y los miocitos depende de canales iónicos, transductores de señal que proporcionan una vía regulada para el movimiento de iones inorgánicos tales como Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^- a través de la membrana plasmática en respuesta a diversos estímulos. Recuerde del Capítulo 11 que estos canales iónicos son "de entrada regulada"; pueden estar abiertos o cerrados según si el receptor asociado ha sido activado por la unión de su ligando específico (un neurotransmisor, por ejemplo) o por un cambio en el potencial eléctrico transmembrana, V_m. La Na^+K^+ ATPasa es electrogénica; crea un desequilibrio de carga a través de la membrana plasmática al transportar 3 Na^+ al exterior de la célula por cada 2 K^+ que introduce **(Fig. 12–24a)**, haciendo el interior negativo con respecto al exterior. Se dice que la membrana está polarizada.

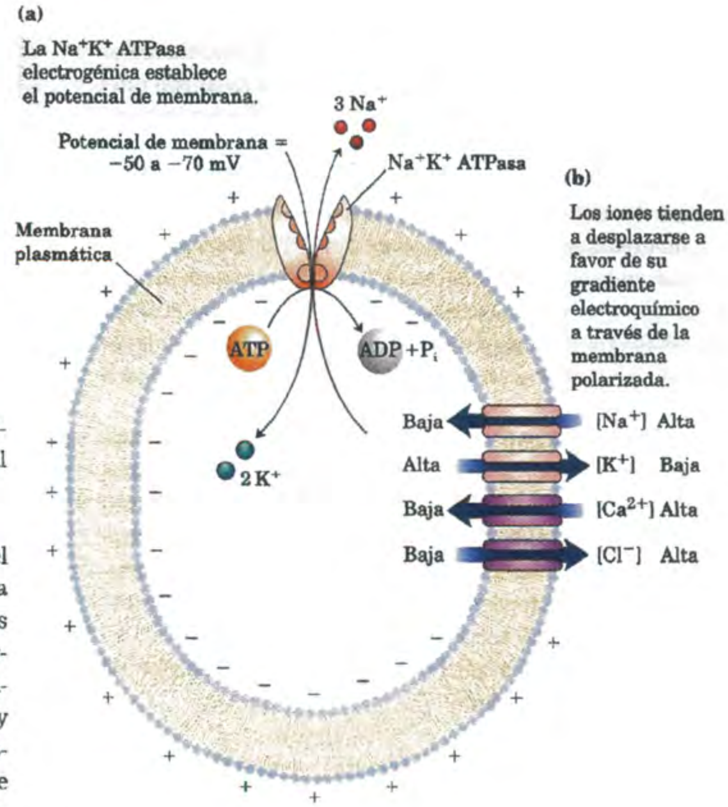


FIGURA 12–24 Potencial eléctrico transmembrana. (a) La Na^+K^+ ATPasa electrogénica produce un potencial eléctrico transmembrana de –60 mV (negativo en el interior). **(b)** Las flechas azules muestran la dirección en la que los iones tienden a moverse espontáneamente a través de la membrana plasmática en una célula animal, impulsados por la combinación de gradientes químicos y eléctricos. El gradiente químico impulsa Na^+ y Ca^{2+} hacia el interior (produciendo despolarización) y K^+ hacia el exterior (produciendo hiperpolarización). El gradiente eléctrico impulsa Cl^- hacia el exterior, en contra de su gradiente de concentración (produciendo despolarización).

CONVENCIÓN CLAVE: V_m es negativo cuando el interior de la célula es negativo con respecto al exterior. Para una célula animal típica, $V_m = -50$ a -70 mV. ■

Debido a que los canales iónicos permiten generalmente el paso de aniones o cationes pero no de ambos, el flujo iónico a través de un canal provoca una redistribución de carga a ambos lados de la membrana, cambiando V_m. La entrada de un ión cargado positivamente tal como el Na^+ o la salida de un ión cargado negativamente tal como el Cl^-, *despolariza* la membrana y acerca V_m a cero. De forma inversa, la salida de K^+ *hiperpolariza* la membrana y V_m se vuelve más negativo. Estos flujos de iones a través de canales son pasivos, a diferencia del transporte activo por la Na^+K^+ ATPasa.

La dirección del flujo espontáneo de un ión a través de una membrana polarizada lo dicta el potencial electroquímico de dicho ión a través de la membrana que tiene dos componentes: la diferencia de concentración (C) del ión a ambos lados de la membrana y la diferencia de potencial eléctrico, expresada normalmente en milivoltios. La fuerza (ΔG) que hace que un catión (por ejemplo, Na^+) pase espontáneamente hacia adentro por un canal iónico es una función de la relación de sus concentraciones en ambos lados de la membrana (C_{in}/C_{out}) y de la diferencia del potencial eléctrico ($\Delta\psi$ o V_m):

$$\Delta G = RT \ln (C_{in}/C_{out}) + Z\mathcal{J}V_m \qquad (12\text{–}1)$$

donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, Z la carga en el ión y $\mathcal{J}$ la constante de Faraday. (Observe que el signo de la carga en el ión determina el signo dels segundo término de la ecuación 12–1.) En una neurona o un miocito típicos, las concentraciones de Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^- en el citosol son muy diferentes de las del fluido extracelular (Tabla 12-6). Dadas estas diferencias en la concentración, el V_m de reposo de –60 mV y la relación que se muestra en la Ecuación 12-1, la apertura de un canal de Na^+ o Ca^{2+} producirá un flujo espontáneo hacia el interior de Na^+ o Ca^{2+} (y la despolarización), mientras que la apertura de un canal de K^+ producirá un flujo espontáneo de K^+ hacia el exterior (y la hiperpolarización) (Fig. 12-24b).

Una especie iónica determinada continúa fluyendo por el canal siempre que la combinación del gradiente de concentración y el potencial eléctrico proporcione la fuerza impulsora. Por ejemplo, a medida que el Na^+ fluye a favor de su gradiente de concentración despolariza la membrana. Cuando el potencial de membrana alcanza los +70 mV, el efecto de este potencial de membrana (resistencia a más entrada de Na^+) iguala exactamente el efecto del gradiente de [Na^+] (provocando el flujo de Na^+ hacia el interior). En este potencial de equilibrio (E), la fuerza impulsora (ΔG) que tiende a mover los iones Na^+ es cero. El potencial de equilibrio es diferente para cada especie iónica porque los gradientes de concentración difieren para cada ión.

El número de iones que debe fluir para producir un cambio fisiológicamente significativo del potencial de membrana es negligible con respecto a las concentraciones de Na^+, K^+ y Cl^- en las células y el fluido extracelular, de modo que los flujos de iones que tienen lugar durante la señalización en células excitables no tienen esencialmente ningún efecto en las concentraciones de dichos iones. Con el Ca^{2+} la situación es diferente; debido a que la [Ca^{2+}] intracelular es generalmente muy baja (~10^{-7} M), el flujo hacia el interior de Ca^{2+} sí puede alterar significativamente la [Ca^{2+}] citosólica.

El potencial de membrana de una célula en un momento determinado es el resultado del tipo y del número de canales iónicos abiertos en ese instante. En la mayoría de células en reposo, están abiertos más canales de K^+ que de Na^+, Cl^- o Ca^{2+}, de modo que el potencial de reposo está más cerca del E del K^+ (–98 mV) que el de cualquier otro ión. Cuando los canales de Na^+, Ca^{2+} o Cl^- están abiertos, el potencial de membrana se desplaza hacia el E del ión respectivo. La apertura y cierre de los canales iónicos sincronizados con precisión y los cambios transitorios resultantes en el potencial de membrana son la base de la señalización eléctrica por la que el sistema nervioso estimula la contracción de los músculos esqueléticos, el latido del corazón o la liberación del contenido de las células secretoras. Además, muchas hormonas ejercen sus efectos mediante la alteración de los potenciales de membrana de sus células diana. Estos mecanismos no están limitados a los animales; los canales

TABLA 12–6 Concentraciones iónicas en células y en fluidos extracelulares (mM)

Tipo de célula	K^+ dentro	K^+ fuera	Na^+ dentro	Na^+ fuera	Ca^{2+} dentro	Ca^{2+} fuera	Cl^- dentro	Cl^- fuera
Axón de calamar	400	20	50	440	≤0,4	10	40–150	560
Músculo de rana	124	2,3	10,4	109	<0,1	2,1	1,5	78

iónicos juegan papeles importantes en las respuestas de las bacterias, los protistas y las plantas a señales medioambientales.

Para ilustrar la acción de los canales iónicos en la señalización de célula a célula, describimos ahora los mecanismos por los que una neurona pasa una señal a lo largo de su longitud y a través de la sinapsis hacia la siguiente neurona (o a un miocito) en un circuito celular, utilizando acetilcolina como neurotransmisor.

Los canales iónicos de compuerta regulada por voltaje producen potenciales de acción neuronales

La señalización en el sistema nervioso se consigue mediante redes de neuronas, células especializadas que transportan un impulso eléctrico (potencial de acción) desde un extremo de la célula (el cuerpo celular) a través de una extensión citoplasmática alargada (el axón). La señal eléctrica desencadena la liberación de moléculas de neurotransmisor en la sinapsis, que transportan la señal a la siguiente célula del circuito. Tres tipos de **canales iónicos de entrada regulada por voltaje** son esenciales para este mecanismo de señalización. A lo largo de toda la longitud del axón hay **canales de Na^+ de entrada regulada por voltaje (Fig. 12–25)**, que están cerrados cuando la membrana está en reposo ($V_m = -60$ mV) pero que se abren momentáneamente cuando la membrana se despolariza localmente en respuesta a acetilcolina (o a algún otro neurotransmisor). La despolarización próxima inducida por la apertura de canales de Na^+ provoca la apertura de **canales de K^+ de entrada regulada por voltaje,** que también están distribuidos a lo largo del axón. El flujo despolarizante de Na^+ al interior del axón (entrada) es rápidamente contrarrestado por un flujo repolarizante de K^+ (salida). En el extremo distal del axón hay **canales de Ca^{2+} de entrada regulada por voltaje,** que se abren cuando llega la onda de despolarización y repolarización producida por la actividad de los canales de Na^+ y K^+, desencadenando entonces la liberación del neurotransmisor acetilcolina, el cual conduce la señal a otra neurona (¡desencadene un potencial de acción!) o a una fibra muscular (¡contráigase!).

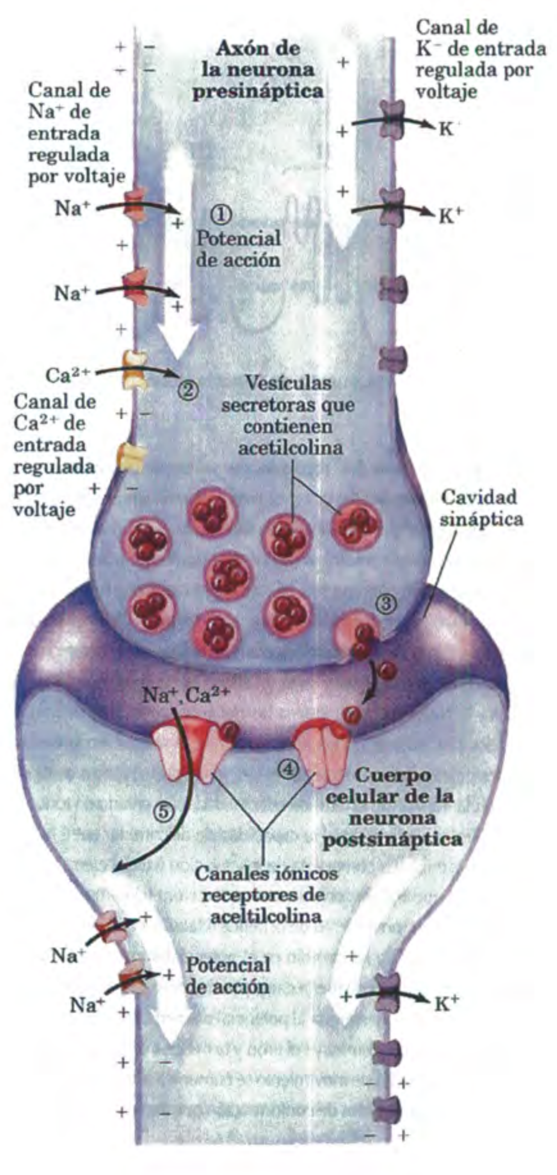
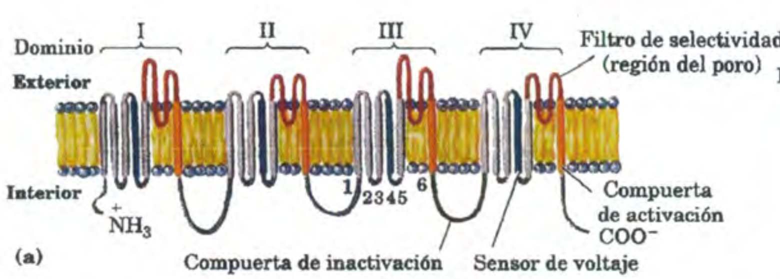


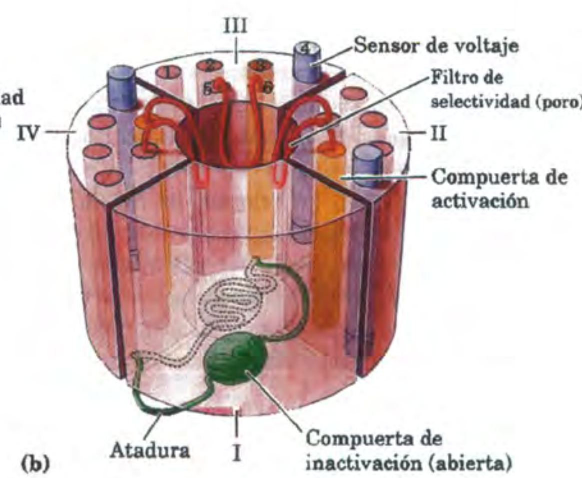
FIGURA 12–25 Papel de los canales iónicos de entrada regulada por voltaje y por ligando en la transmisión neuronal. Inicialmente, la membrana plasmática de la neurona presináptica está polarizada (interior negativo) a través de la acción de la Na^+K^+ ATPasa electrogénica, que bombea 3 Na^+ hacia fuera por cada 2 K^+ bombeados hacia el interior de la neurona (véase la Fig. 12–24). ① Un estímulo a esta neurona (no mostrado) provoca que un potencial de acción se desplace a lo largo del axón (flecha blanca), lejos del cuerpo celular. La apertura de un canal de Na^+ regulado por voltaje permite la entrada de Na^+, y la despolarización local resultante provoca la apertura del canal de Na^+ adyacente, y así sucesivamente. La direccionalidad de movimiento del potencial de acción está asegurada por el corto período refractario que sigue a la apertura de cada canal de Na^+ de entrada regulada por voltaje. ② Cuando una onda de despolarización alcanza la punta del axón, se abren los canales de Ca^{2+} de entrada regulada por voltaje, permitiendo la entrada de Ca^{2+}. ③ El incremento resultante de la $[Ca^{2+}]$ interna provoca la liberación exocítica del neurotransmisor acetilcolina a la cavidad sináptica. ④ La acetilcolina se une a un receptor en la neurona postsináptica (o en un miocito), provocando la apertura de su canal iónico de entrada regulada por ligando. ⑤ Na^+ y Ca^{2+} extracelulares entran a través de este canal, despolarizando la célula postsináptica. La señal eléctrica ha pasado de este modo al cuerpo celular de la neurona postsináptica (o del miocito) y se desplazará a lo largo de su axón hacia una tercera neurona (o un miocito) con esta misma secuencia de acontecimientos.

Los canales de Na^+ regulados por voltaje son muy selectivos para el Na^+ sobre otros cationes (en un factor de 100 o más) y tienen una velocidad de flujo muy elevada ($>10^7$ iones/s). Después de abrirse —activarse— debido a una reducción del potencial eléctrico transmembrana, un canal de Na^+ experimenta una inactivación muy rápida: en el espacio de milisegundos se cierra el canal y permanece activo durante muchos milisegundos. A medida que se abren los canales de K^+ regulados por voltaje en respuesta a la polarización inducida por la abertura de los canales de Na^+, la consiguiente salida de K^+ repolariza localmente la membrana. Un pulso breve de despolarización recorre así el axón a medida que la despolarización local dispara la breve apertura de los canales de Na^+ vecinos, y luego la de los canales de K^+ (Fig. 12-25). Después de cada apertura de un canal de Na^+, le sigue un corto período refractario durante el cual este canal no puede volver a abrirse, lo que asegura que una onda de despolarización unidireccional el potencial de acción, barra desde el cuerpo de la célula nerviosa hacia el extremo del axón (paso ① en la Fig. 12-25).

Cuando la onda de despolarización alcanza los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, éstos se abren (paso ②) y el Ca^{2+} entra desde el espacio extracelular. La elevación en la $[Ca^{2+}]$ citosólica provoca la liberación de acetilcolina por exocitosis a la hendidura postsináptica (falso ③). La acetilcolina difunde hacia la célula postsináptica (otra neurona o un miocito), donde se une a los receptores de acetilcolina y provoca la despolarización. Así, el mensaje pasa a la siguiente célula en el circuito. Vemos, entonces, que los canales iónicos regulados por compuerta transmiten señales por una de estas dos vías: mediante la alteración de la concentración citosólica de un ión (tal como el Ca^{2+}), que actúa entonces como segundo mensajero intracelular, o bien por un cambio de V_m que afecta a otras proteínas de membrana, que son sensibles al V_m. El paso de una señal eléctrica a través de una neurona y de ella a la siguiente ilustra ambos tipos de mecanismo.

Ya vimos con cierto detalle la estructura y mecanismo de los canales de K^+ regulados por voltaje en la Sección 11.3 (véanse las Figs. 11–48 a 11–50). Aquí analizamos más detalladamente los canales de Na^+. El componente esencial de un canal de Na^+ es un polipéptido único de grandes dimensiones (1.840 residuos aminoácidos) organizado en cuatro dominios agrupados alrededor de un canal central **(Fig. 12–26a, b)**, que proporcionan un paso para el Na^+ a través de la membrana. El paso es específico para Na^+ gracias a una "región de poro"





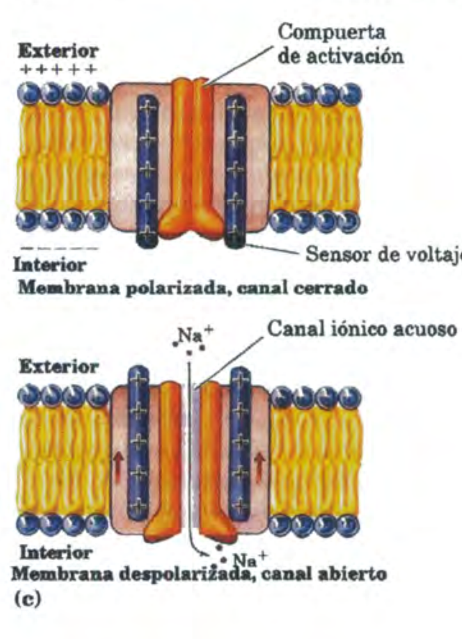


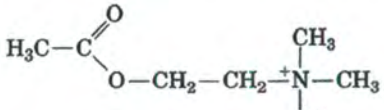
FIGURA 12–26 Canales de Na^+ regulados por voltaje de las neuronas. Los canales de sodio de los diferentes tejidos y organismos tienen difeentes subunidades, si bien sólo la subunidad principal (α) es esencial. **(a)** La subunidad α es una proteína grande con cuatro dominios homólogos (I a IV, que se muestran aquí espaciados para ilustrar las partes), cada uno con seis hélices transmembrana (1 a 6). La hélice 4 de cada dominio (azul) es el sensor de voltaje; se cree que la hélice 6 (naranja) es la compuerta de activación. Los segmentos entre las hélices 5 y 6, la región del poro (rojo), constituyen el filtro de selectividad, mientras que el segmento que conecta los dominios III y IV (verde) es la compuerta de inactivación. **(b)** Los cuatro dominios están enrollados alrededor de un canal central transmembrana recubierto de residuos aminoácidos polares. Las cuatro regiones del poro (rojo) se juntan cerca de la superficie extracelular formando el filtro de selectividad, conservado en todos los canales de Na^+. El filtro confiere al canal la capacidad de discriminar entre Na^+ y otros iones de tamaño similar. La compuerta de inactivación (verde) cierra (líneas a trazos) poco después de que abra la compuerta de activación. **(c)** El mecanismo sensor del voltaje consiste en un movimiento de la hélice 4 (azul) perpendicular al plano de la membrana en respuesta a un cambio en el potencial transmembrana. Tal como se muestra en la parte superior, la fuerte carga positiva de la hélice 4 permite que sea estirada hacia el interior en respuesta al potencial de membrana negativo en el interior (V_m). La despolarización disminuye el tirón y la hélice 4 se relaja, moviéndose hacia el exterior (parte inferior). Este movimiento se comunica a la compuerta de activación (naranja), induciendo cambios de conformación que abren el canal en respuesta a la despolarización.

compuesta por los segmentos entre las hélices transmembrana 5 y 6 de cada dominio, que se pliegan sobre el canal. La hélice 4 de cada dominio tiene una elevada densidad de residuos Arg cargados positivamente; se cree que este segmento se mueve dentro de la membrana en respuesta a cambios en el voltaje transmembrana, desde el potencial de reposo de unos −60 mV a alrededor de +30 mV. El movimiento de la hélice 4 desencadena la abertura del canal, siendo ello la base de la regulación por voltaje (Fig. 12-26c).

Se supone que la inactivación del canal se debe a un mecanismo de bola y cadena. Un dominio proteico en la superficie citoplasmática del canal de Na^+, la compuerta de inactivación (la bola), está ligado al canal mediante un corto segmento del polipéptido (la cadena; Fig. 12–26b). Este dominio puede moverse libremente cuando el canal está cerrado, pero cuando se abre un sitio de la cara interna del canal se hace asequible para que la bola ligada se una al mismo, bloqueando el canal. La longitud de la ligadura parece determinar cuánto tiempo permanece abierto un canal iónico: cuanto más larga sea la ligadura, más largo es el período de apertura. Otros canales iónicos regulados pueden ser inactivados mediante un mecanismo similar.

El receptor de acetilcolina es un canal iónico regulado por ligando

El **receptor nicotínico de acetilcolina** favorece el paso de una señal eléctrica en algunos tipos de sinapsis y en una unión neuromuscular (entre una neurona motora y una fibra muscular), dando señal al músculo para que se contraiga. (Los receptores nicotínicos de acetilcolina se distinguieron originalmente de los receptores muscarínicos de acetilcolina por la sensibilidad de los primeros a la nicotina y los segundos a la muscarina, un alcaloide presente en los hongos. Los dos son estructural y funcionalmente diferentes.) La acetilcolina liberada por la neurona presináptica, o motora, difunde unos pocos micrómetros hasta la membrana plasmática de la neurona postsináptica o de un miocito, en donde se une al receptor de acetilcolina. Esto fuerza un cambio conformacional en el receptor, haciendo que se abra su canal iónico. El movimiento resultante de cationes hacia el interior despolariza la membrana plasmática. En una fibra muscular esto provoca la contracción. El receptor de acetilcolina permite el paso inmediato de los iones Na^+, Ca^{2+} y K^+, pero no en cambio el de otros cationes y de la totalidad de aniones. El paso de Na^+ a través del canal iónico de un receptor de acetilcolina es insaturable (su velocidad es lineal con respecto a la $[Na^+]$) y muy rápido (unos 2×10^7 iones/s en condiciones fisiológicas).



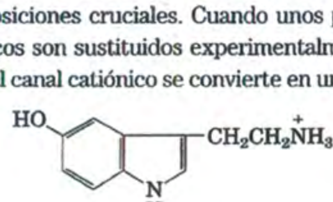
Acetilcolina

Como otros canales iónicos regulados, el receptor de acetilcolina se abre en respuesta a la estimulación por su molécula señal y tiene un mecanismo temporizador intrínseco que cierra la compuerta unos milisegundos después. Por tanto, la señal de la acetilcolina es transitoria, hecho que, como hemos visto, es una característica esencial de la conducción de una señal eléctrica. Conocemos los cambios estructurales básicos de la regulación del receptor de acetilcolina, pero no el mecanismo exacto de "desensibilización" mediante el cual la compuerta permanece cerrada incluso con la presencia continuada de acetilcolina.

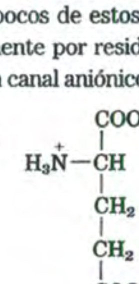
El recepto nicotínico de acetilcolina tiene cinco subunidades: copias sencillas de las subunidades β, γ y δ, y dos subunidades α idénticas, cada una de las cuales contiene un sitio de unión de acetilcolina. Las cinco subunidades están relacionadas en secuencia y en estructura terciaria: cada una de ellas tiene cuatro segmentos helicoidales transmembrana (M1 a M4) **(Fig. 12–27a)**. Las cinco subunidades rodean un poro central que está recubierto con sus hélices M2 (Fig. 12-27b, c). El poro tiene una amplitud de unos 20 Å en las partes del canal que sobresalen en las superficies citoplasmática y extracelular, pero se estrecha cuando pasa a través de la bicapa lipídica. Cerca del centro de la bicapa hay un anillo de cadenas laterales voluminosas hidrofóbicas de residuos de Leu en las hélices M2, colocadas tan cerca unas de otras que impiden el paso de iones a través del canal (Fig. 12-27d). Los cambios conformacionales alostéricos inducidos por la unión de acetilcolina a las dos subunidades α incluyen un giro ligero de las hélices M2, que alejan estas cadenas laterales hidrofóbicas del centro del canal, abriéndolo al paso de iones.

Las neuronas tienen canales receptores que responden a diferentes neurotransmisores

Las células animales, especialmente las del sistema nervioso, contienen diferentes canales iónicos de entrada regulada por ligandos, por voltaje o por ambos. Hasta el momento sólo nos hemos ocupado de la acetilcolina como neurotransmisor, pero hay muchos más. La 5-hidroxitriptamina (serotonina), el glutamato y la glicina pueden actuar todos ellos a través de canales receptores que están estructuralmente relacionados con el receptor de acetilcolina. La serotonina y el glutamato provocan la apertura de canales catiónicos (K^+, Na^+, Ca^{2+}), mientras que la glicina abre canales de Cl^- específicos. Los canales catiónicos y los aniónicos se distinguen por diferencias sutiles en los residuos aminoácidos que revisten el canal hidrofílico. Los canales catiónicos tienen cadenas laterales de Glu y Asp cargadas negativamente en posiciones cruciales. Cuando unos pocos de estos residuos acídicos son sustituidos experimentalmente por residuos básicos, el canal catiónico se convierte en un canal aniónico.



Serotonina (5-hidroxitriptamina)



Glutamato

Según sea el ión que pasa a través de un canal, la unión del ligando (neurotransmisor) para este canal bien despolariza o bien hiperpolariza la célula diana. Una sola neurona recibe información de otras muchas neuronas, cada una de las cuales libera su propio neurotransmisor característico con su efecto despolarizante o hiperpolarizante. El V_m de la célula diana refleja por tanto la aporta-

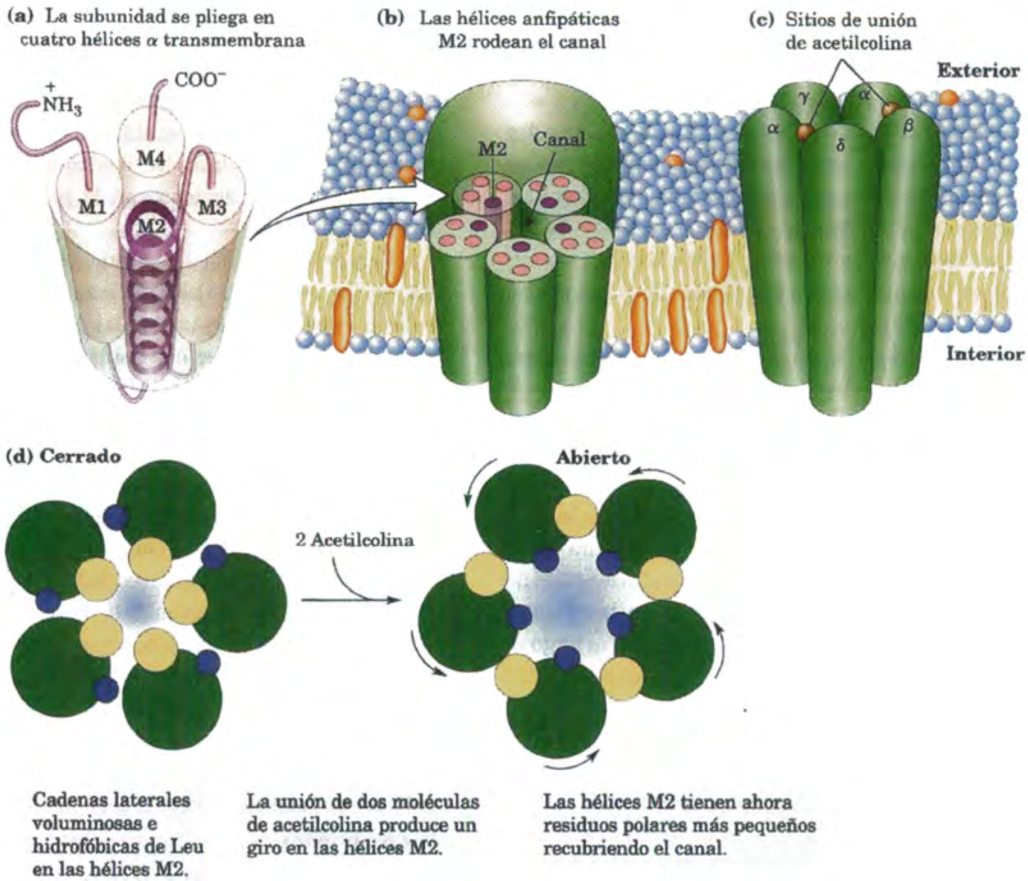


FIGURA 12–27 El canal iónico del receptor de acetilcolina. **(a)** Cada una de las cinco subunidades homólogas ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) tiene cuatro hélices transmembrana, M1 a M4. Las hélices M2 son anfipáticas; las otras tienen principalmente residuos hidrofóbicos. **(b)** Las cinco subunidades están dispuestas alrededor de un canal central transmembrana, que está recubierto con los lados polares de las hélices M2. En las partes superior e inferior del canal hay anillos de residuos aminoácidos cargados negativamente. **(c)** Modelo del receptor de acetilcolina, basado en la determinación de la estructura por microscopía electrónica y rayos X de una proteína relacionada (la proteína de unión de acetilcolina de un molusco). **(d)** Esta vista superior de una sección transversal a través del centro de las hélices M2 muestra cinco cadenas laterales de Leu (amarillo), una de cada hélice M2, sobresaliendo hacia el interior del canal, constriñéndolo a un diámetro demasiado pequeño para permitir el paso de Ca^{2+}, Na^+ o K^+. Cuando los dos sitios receptores de acetilcolina (uno en cada subunidad α) están ocupados, se produce un cambio conformacional. Al tiempo que las hélices M2 giran ligeramente, los cinco residuos Leu giran alejándose del canal y son reemplazados por residuos polares más pequeños (azul). Este mecanismo de regulación abre el canal, permitiendo el paso de Ca^{2+}, Na^+ o K^+.

ción *integrada* (Fig. 12–1d) de múltiples neuronas. La célula responde con un potencial de acción sólo si la aportación integrada llega a una despolarización neta de tamaño suficiente.

Los canales receptores de acetilcolina, glicina, glutamato y ácido γ-aminobutírico (GABA) son de entrada regulada por ligandos *extracelulares*. Los segundos mensajeros *intracelulares*, tales como cAMP, cGMP, IP_3, Ca^{2+} y ATP, regulan canales iónicos de otra clase, que, como veremos más adelante en la Sección 12.10, participan en las transducciones sensoriales de la visión, del olfato y del gusto.

Las toxinas apuntan a los canales iónicos

Un gran número de las toxinas más potentes que se encuentran en la naturaleza actúan sobre canales iónicos. Tal como observamos en la Sección 11.3, por ejemplo, la dendrotoxina (de la serpiente mamba negra) bloquea la acción de canales de K^+ regulados por voltaje, la tetrodoxina (producida por el pez globo) actúa sobre canales de Na^+ regulados por voltaje y la cobrotoxina inutiliza los canales iónicos de los receptores de acetilcolina. ¿Por qué en el decurso de la evolución los canales iónicos se han convertido en la diana preferida de las toxinas en lugar de alguna diana metabólica crítica tal como un enzima esencial en el metabolismo energético?

Los canales iónicos son amplificadores extraordinarios; la abertura de un solo canal permite el flujo de millones de iones por segundo. En consecuencia, se necesitan relativamente pocas moléculas de una proteína de un canal iónico por neurona para señalizar funciones. Esto significa que un número relativamente pequeño de moléculas de toxina con gran afinidad hacia los canales iónicos, actuando desde el exterior de la célula, pueden tener un efecto muy pronunciado sobre la neuroseñalización en todo el cuerpo. Un efecto comparable a través de un enzima del metabolismo, presente normalmente en las células a concentraciones mucho más elevadas que los canales iónicos, necesitaría muchas más moléculas de la molécula de toxina.

RESUMEN 12.6 Canales iónicos de compuerta

- Los canales iónicos de compuerta regulados por ligandos o por potencial de membrana son de gran importancia para la señalización en neuronas y otras células.
- Los canales de Na^+ y K^+ de compuerta regulada por voltaje de las membranas neuronales transportan el potencial de acción a lo largo del axón en forma de onda de despolarización (entrada de Na^+) seguido de la repolarización (salida al exterior de K^+).
- La regulación de los canales sensibles al voltaje implica el movimiento, perpendicular al plano de la membrana, de un péptido transmembrana con una elevada densidad de carga, debido a la presencia de Arg o de otros residuos cargados.
- La llegada de un potencial de acción al extremo distal de una célula presináptica desencadena la liberación del neurotransmisor. El neurotransmisor (acetilcolina, por ejemplo) difunde a la célula postsináptica (o al miocito en una unión neuromuscular), se une a receptores específicos en la membrana plasmática y desencadena un cambio en V_m.
- El receptor de acetilcolina de las neuronas y miocitos es un canal iónico de compuerta regulada por ligando; la unión de acetilcolina desencadena un cambio conformacional que abre el canal a los iones Na^+ y Ca^{2+}.
- Las neurotoxinas producidas por muchos organismos atacan canales iónicos neuronales, por lo que actúan rápida y letalmente.

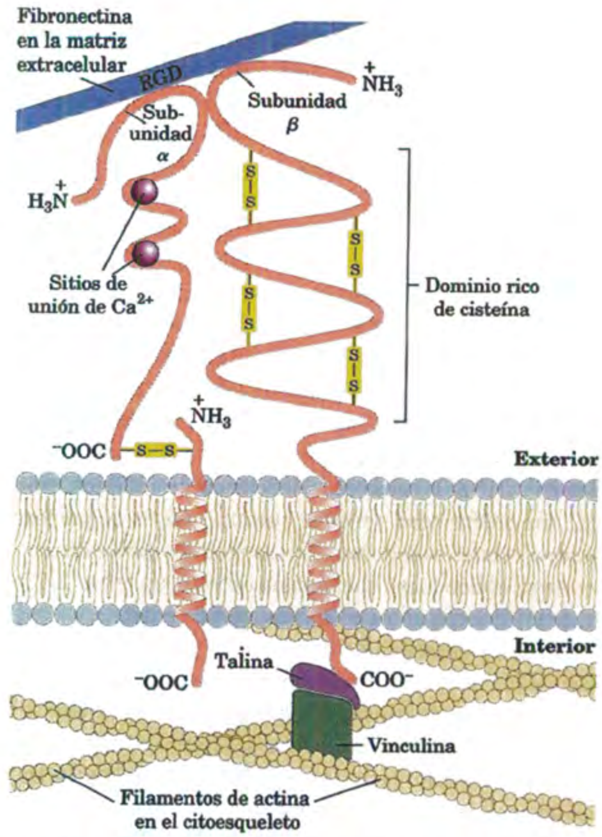


FIGURA 12–28 Señalización bidireccional por las integrinas. Todas las integrinas tienen una subunidad α y una β, cada una con una extensión citoplasmática corta, una única hélice transmembrana y un dominio extracelular grande con el sitio de unión de ligando. La subunidad β es rica en residuos Cys y tiene muchos enlaces disulfuros intracatenarios. La subunidad α de muchas integrinas tiene varios sitios de unión para cationes divalentes tales como Ca^{2+}, que son intrínsecos a la actividad de unión de ligandos. Los ligandos en la matriz extracelular incluyen proteínas como el colágeno que tienen la secuencia RGD reconocida por una integrina, o componentes proteoglucanos tales como el sulfato de heparán. La unión de ligando extracelular se comunica a los dominios citosólicos, produciendo cambios conformacionales que afectan a la asociación de la integrina con proteínas tales como la talina que, a su vez, conectan la integrina a filamentos de actina del citoesqueleto que se extienden por debajo de la membrana plasmática. La unión de ligandos proteicos intracelulares al dominio citosólico puede alterar la afinidad de la integrina por sus ligandos extracelulares asociados, cambiando la adhesión de la célula a la matriz extracelular.

12.7 Integrinas: receptores de adhesión celular bidireccionales

Las **integrinas** son proteínas de la membrana plasmática que actúan en la adhesión entre células y entre células y la matriz celular, además de llevar señales en ambas direcciones a través de la membrana **(Fig. 12–28)**. El genoma de los mamíferos codifica 18 subunidades α diferentes y 8 subunidades β diferentes que están en diversas combinaciones con varias especificidades de unión de ligando en diferentes tejidos. Cada una de las 24 integrinas diferentes encontradas parecen tener una función única. Puesto que pueden informar a las células sobre el entorno extracelular próximo, las integrinas son cruciales en procesos que requieren interacciones intercelulares selectivas, tales como el desarrollo embrionario, la coagulación de la sangre, la función inmune celular y el crecimiento de tumores y metástasis.

Entre los ligandos extracelulares que interaccionan con las integrinas se cuentan el colágeno, el fibrinógeno, la fibronectina y otras muchas proteínas que contienen la secuencia reconocida por las integinas: –Arg–Gly–Asp– (RGD). Las extensiones citoplasmáticas cortas de las subunidades α y β interaccionan con proteínas del citoesqueleto justo debajo de la membrana plasmática (talina, α-actinina, vinculina, paxilina y otras), modulando el ensamblaje de las estructuras del citoesqueleto sustentadas por la actina. La asociación dual de integrinas con la matriz extracelular y con el citoesqueleto permite que la célula integre información sobre sus entornos extra e intracelulares y coordine así la posición del citoesqueleto con los sitios de adhesión extracelulares. Con esta capacidad, las integrinas gobiernan la forma, la motilidad, la polaridad y la diferenciación de muchos tipos de células. En la señalización de "fuera a dentro", los dominios extracelulares de una integrina experimentan cambios conformacionales globales importantes cuando el ligando se une a un sitio que está alejado muchos angstroms de las hélices transmembrana. Estos cambios alteran las disposiciones de las colas citoplasmáticas de las subunidades α y β, cambiando sus interacciones con proteínas intracelulares y conduciendo la señal al interior.

La conformación y adhesividad de los dominios extracelulares de las integrinas también se alteran fuertemente por señales del *interior* de la célula. En una conformación, los dominios extracelulares no tienen afinidad por las proteínas de la matriz extracelular, pero señales originadas en la célula pueden fa-

vorecer otra conformación en la que las integrinas se adhieren fuertemente a proteínas extracelulares (Fig. 12-28).

La regulación de la adhesividad es de suma importancia para que los leucocitos encuentren el camino hasta el sitio de una infección (véase la Fig. 7-31), en las interacciones entre células inmunes y en la fagocitosis por parte de los macrófagos. Durante una respuesta inmune, por ejemplo, las integrinas de los leucocitos están activadas (exponen sus sitios de unión de ligando extracelulares) desde el interior de la célula vía una ruta de señalización desencadenada por citoquinas (señales de desarrollo extracelulares). Activadas de este modo, las integrinas pueden actuar en la unión de los leucocitos a otras células inmunes o pueden señalar células para la fagocitosis. La mutación en un gen de integrina que codifica la subunidad β conocida como CD18 es la causa de la deficiencia de adhesión leucocitaria, una enfermedad genética humana rara en la que los leucocitos no pueden salir de los vasos sanguíneos para alcanzar los sitios de infección. Los bebés con un defecto grave en CD18 mueren de infecciones antes de los dos años de edad.

Una integrina específica de las plaquetas ($\alpha_{IIb}\beta_3$) interviene en la coagulación sanguínea, tanto normal como patológica. El daño local a los vasos sanguíneos en el lugar de una herida expone sitios de unión de alta afinidad (secuencias RGD en la trombina y en el colágeno, por ejemplo) para las integrinas de las plaquetas, las cuales se unen a la lesión, a otras plaquetas y a la proteína de la coagulación fibrinógeno, lo que lleva a la formación del coágulo que corta la hemorragia. Las mutaciones en las subunidades α o β de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ plaquetaria son causa de una enfermedad hemorrágica conocida como tromboastenia de Glanzmann, en la que los individuos sangran excesivamente tras una herida relativamente leve. La coagulación sanguínea hiperefectiva tampoco es deseable. La falta de regulación de la adhesión de las plaquetas puede conducir a la formación patológica de coágulos de sangre, con el consiguiente riesgo de infarto de miocardio y de embolia. Los medicamentos tales como el tirofibán y la eptifibatida que bloquean los sitios de unión de ligando externos de la integrina plaquetaria reducen la formación de coágulos, siendo útiles en el tratamiento y la prevención de infartos y embolias.

Cuando los tumores forman metástasis, las células tumorales pierden su adhesión al tejido de origen e invaden nuevas áreas. Tanto los cambios en la adhesión de las células tumorales como el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que permiten el desarrollo del tumor en una nueva localización están modulados por integrinas específicas. Estas proteínas son, por tanto, dianas potenciales para medicamentos que supriman la migración y la relocalización de las células tumorales. ■

RESUMEN 12.7 Integrinas: receptores de adhesión celular bidireccionales

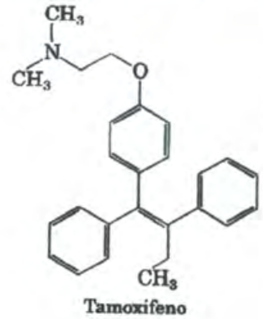
- Las integrinas son una familia de receptores diméricos ($\alpha\beta$) de la membrana plasmática que interaccionan con macromoléculas extracelulares y con el citoesqueleto, transportando señal al interior y al exterior de la célula.
- Las formas activa e inactiva de una integrina difieren en la conformación de sus dominios extracelulares. Acontecimientos y señales intracelulares pueden interconvertirlas.
- Las integrinas intervienen en diversos aspectos de la respuesta inmune, de la coagulación de la sangre y de la angiogénesis, y tienen un papel en la metástasis de tumores.

12.8 Regulación de la transcripción por hormonas esteroideas

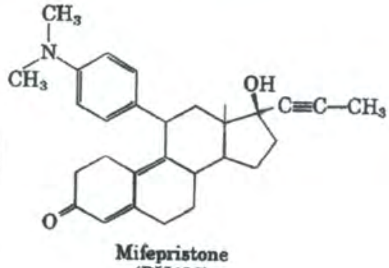
Un gran grupo de esteroides, el ácido retinoico (retinoide) y las hormonas tiroideas forman un amplio grupo de hormonas (ligandos de receptores) que ejercen sus efectos, al menos en parte, por un mecanismo esencialmente diferente del de otras hormonas: actúan en el núcleo alterando la expresión génica. Discutiremos su modo de acción en detalle en el Capítulo 28, junto con otros mecanismos que regulan la expresión génica.

Las hormonas esteroideas (estrógeno, progesterona y cortisol, por ejemplo), demasiado hidrofóbicas para disolverse fácilmente en la sangre, se transportan por proteínas transportadoras específicas desde su punto de liberación hasta sus tejidos diana. En las células diana, estas hormonas pasan a través de la membrana plasmática por simple difusión y se unen a proteínas receptoras específicas en el núcleo (**Fig. 12-29**). Los receptores de las hormonas esteroideas sin ligando unido (aporreceptores) a menudo actúan suprimiendo la transcripción de genes diana. La unión de la hormona desencadena cambios de conformación de una proteína receptora y de esta forma es capaz de interaccionar con secuencias reguladoras específicas de DNA denominadas **elementos de respuesta a hormonas (HRE),** alterando así la expresión génica (véase la Fig. 28-34). El complejo receptor-hormona unida intensifica la expresión de genes específicos adyacentes a HRE con la ayuda de otras proteínas esenciales para la transcripción. Se requieren horas o días para que estos reguladores tengan un efecto completo, el tiempo requerido para que los cambios en la síntesis de RNA y la posterior síntesis de proteínas sean evidentes en forma de un metabolismo alterado.

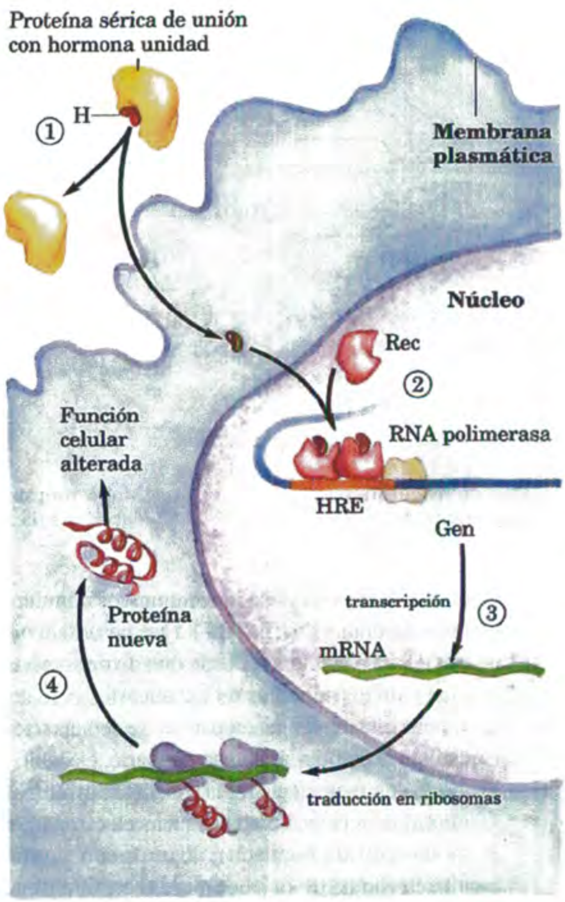
La especificidad de la interacción esteroide-receptor se explota en el uso del fármaco **tamoxifeno** para tratar el cáncer de mama. En algunos tipos de cáncer de mama, la división de las células cancerosas depende de la presencia continua de estrógeno. El tamoxifeno es un antagonista del estrógeno; compite con el estrógeno para unirse al receptor de estrógeno, pero el complejo tamoxifeno-receptor no tiene efecto, o muy poco, en la expresión génica. En consecuencia, la administración de tamoxifeno tras cirugía o durante la quimioterapia del cáncer de mama dependiente de hormonas detiene o hace más lento el crecimiento de las células cancerosas restantes. Otro análogo de esteroide, el fármaco **mifepristone (RU486),** se une al receptor de progesterona y bloquea la acción de la hormona esencial para la implantación del óvulo fertilizado en el útero. ■



Tamoxifeno



Mifepristone (RU486)



① La hormona (H), transportada al tejido diana en proteínas de unión del suero, difunde a través de la membrana plasmática y se une a su receptor específico completamente diferente.

② La unión de la hormona provoca un cambio de conformación de Rec; forma homo- o heterodímeros con otros complejos receptor-hormona y se une a regiones reguladoras específicas llamadas elementos de respuesta a hormonas (HRE) del DNA adyacente a genes específicos.

③ El receptor atrae proteínas coactivadoras o correpresoras y, con ellas, regula la transcripción de genes adyacentes, aumentando o disminuyendo la velocidad de formación de mRNA.

④ Niveles alterados del producto génico regulado por la hormona producen una respuesta celular a la hormona.

FIGURA 12–29 Mecanismo general por el que las hormonas esteroideas y tiroideas, retinoides y vitamina D regulan la expresión génica. Los detalles de la transcripción y síntesis de proteínas se discuten en los Capítulos 26 y 27. Algunos esteroides también actúan a través de receptores de la membrana plasmática por un mecanismo completamente diferente.

El mecanismo clásico para la acción de las hormonas esteroideas a través de receptores nucleares no explica ciertos efectos de los esteroides que son demasiado rápidos para ser el resultado de una síntesis proteica alterada. Por ejemplo, se sabe que la dilatación de los vasos sanguíneos mediante estrógenos es independiente de la transcripción génica o de la síntesis de proteínas, al igual que el descenso de la [cAMP] celular inducida por esteroides. Otro mecanismo de transducción en el que intervendrían receptores de la membrana plasmática podría ser responsable de estos efectos.

RESUMEN 12.8 Regulación de la transcripción por hormonas esteroideas

- Las hormonas esteroideas entran en las células y se unen a receptores específicos.
- El complejo hormona-receptor se une a regiones específicas de DNA, los elementos de respuesta hormonales, e interacciona con otras proteínas para regular la expresión de genes próximos.
- Algunos de los efectos de las hormonas esteroideas se producen a través de otra vía de señalización más rápida.

12.9 Señalización en microorganismos y plantas

Gran parte de lo que hemos dicho aquí sobre señalización hace referencia a tejidos de mamíferos o a células de dichos tejidos en cultivo. Las bacterias, las arqueobacterias, los microorganismos eucarióticos y las plantas vasculares también han de responder a señales externas tales como O_2, nutrientes, luz, productos químicos nocivos, etc. Consideraremos ahora de forma breve las clases de maquinaria de señalización que utilizan los microorganismos y las plantas.

La señalización bacteriana necesita la fosforilación en un sistema de dos componentes

Escherichia coli responde a los nutrientes de su entorno, entre ellos azúcares y aminoácidos, nadando hacia ellos impulsada por uno o unos pocos flagelos. Una familia de proteínas de membrana tienen dominios de unión en el exterior de la membrana plasmática a la que se unen **atrayentes** (azúcares o aminoácidos) (**Fig. 12–30**). La unión del ligando hace que otro dominio del interior de la membrana plasmática se autofosforile en un residuo His. Este primer componente del **sistema de señalización de dos componentes**, el **receptor histidina quinasa,**

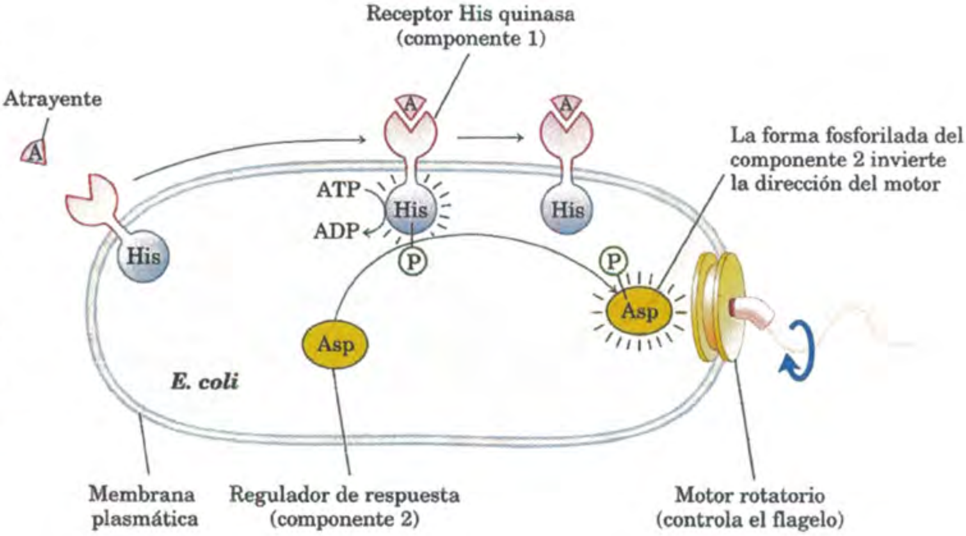


FIGURA 12–30 Mecanismo de señalización de dos componentes en la quimio-taxis bacteriana. Cuando un ligando atrayente (A) se une al dominio receptor del receptor unido a membrana, se activa una proteína His quinasa en el dominio citosólico (componente 1) y se autofosforila en una residuo His. Este grupo fosforilo se transfiere seguidamente a un residuo Asp del componente 2 (en algunos casos, como el que se muestra aquí, una proteína separada; en otros, otro dominio de la proteína receptora). Después de la fosforilación el componente 2 se desplaza a la base del flagelo en donde invierte la dirección de rotación del motor flagelar.

cataliza seguidamente la transferencia del grupo fosforilo desde el residuo His a un residuo Asp en una segunda proteína que es soluble, el **regulador de respuesta;** esta fosfoproteína se desplaza a la base del flagelo transportando la señal del receptor de membrana. El flagelo está impulsado por un motor rotatorio que puede impulsar a la célula a través del medio o hacer que se pare, según sea la dirección de rotación del motor. La información desde el receptor permite que la célula determine si se desplaza hacia la fuente de atrayente o se aleje de ella. Si su movimiento es hacia el atrayente, el regulador de respuesta señala a la célula que continúe en línea recta; si es alejándose de él, la célula da un tumbo momentáneo cambiando de dirección. La repetición de este comportamiento da lugar a una trayectoria aleatoria, con una propensión por un movimiento en la dirección de incremento en la concentración de atrayente.

E. coli detecta no sólo azúcares y aminoácidos, sino también O_2, extremos de temperatura y otros factores ambientales utilizando este sistema básico de dos componentes. También se han detectado sistemas de dos componentes en otras muchas bacterias, tanto gram-positivas como gram-negativas y arqueobacterias, así como en protistas y hongos. Está claro que este mecanismo de señalización apareció pronto en el transcurso de la evolución celular y que se ha conservado.

Diversos sistemas de señalización utilizados por las células animales tienen también análogos en bacterias. A medida que se conocen los genomas completos de más, y más diversas, bacterias, se han descubierto genes que codifican proteínas similares a proteína Ser o Thr quinasas, proteínas tipo Ras reguladas por la unión de GTP y proteínas con dominios SH3. No se han detectado Tyr quinasas de receptores en bacterias, pero en algunas proteínas bacterianas se encuentran residuos Ⓟ–Tyr, por lo que debe existir un enzima que fosforile residuos Tyr.

Los sistemas de señalización en plantas tienen algunos de los componentes utilizados por microbios y mamíferos

Al igual que los animales, las plantas vasculares han de tener un medio de comunicación entre tejidos para coordinar y dirigir el crecimiento y el desarrollo; para adaptarse a las condiciones de O_2, nutrientes, luz, temperatura y disponibilidad de agua, y para alertar de la presencia de compuestos químicos nocivos y patógenos dañinos (**Fig. 12–31**). Han pasado al menos mil millones de años de evolución desde que divergieron las ramas de las plantas y de los animales en los eucariotas, lo que se refleja en las diferencias de los mecanismos de señalización: algunos mecanismos de plantas se han conservado, es decir, son similares a los de los animales (proteína quinasas, proteínas adaptadoras, nucleótidos cíclicos, bombas iónicas electrogénicas y canales iónicos de entrada regulada); algunos son similares a los sistemas bacterianos de dos componentes, mientras que otros son propios de las plantas (mecanismos sensores de la luz por ejemplo) (Tabla 12–7). El genoma de la planta *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, codifica unas 1.000 proteína Ser/Thr quinasas, entre las que hay unas 60 MAPK y cerca de 400 receptor quinasas asociadas a membrana que fosforilan residuos Ser o Thr; diversas proteína fosfatasas; proteínas adaptadoras en las

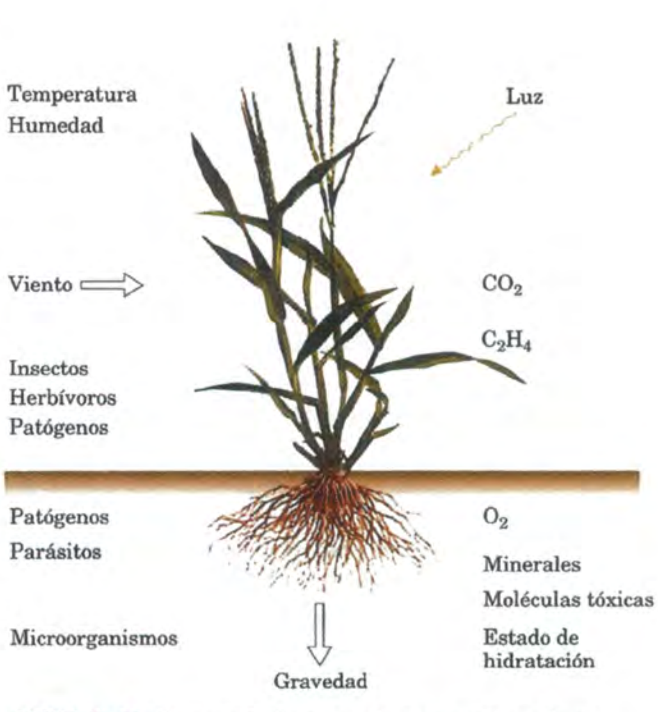


FIGURA 12–31 Algunos estímulos que producen respuestas en plantas.

TABLA 12–7 Componentes de señalización en mamíferos, vegetales o bacterias

Proteína señalizadora	Mamíferos	Vegetales	Bacterias
Canales iónicos	+	+	+
Bombas iónicas electrogénicas	+	+	+
His-quinasas de dos componentes	+	+	+
Adenilil ciclasa	+	+	+
Guanilil ciclasa	+	+	?
Proteína quinasas de receptor (Ser/Thr)	+	+	?
Ca^{2+} como segundo mensajero	+	+	?
Canales de Ca^{2+}	+	+	?
Calmodulina, proteína de unión a CaM	+	+	–
Cascada MAPK	+	+	–
Canales regulados por nucleótido cíclico	+	+	–
Canales de Ca^{2+} regulados por IP_3	+	+	–
Fosfatidilinositol quinasas	+	+	–
GPCR	+	+/–	+
Proteínas G triméricas	+	+/–	–
Fosfolipasa C específica de PI	+	?	–
Receptores tirosina quinasa	+	?	–
Dominios SH2	+	?	?
Receptores nucleares de esteroides	+	–	–
Proteína quinasa A	+	–	–
Proteína quinasa G	+	–	–

que se reúnen proteínas de complejos de señalización; enzimas para la síntesis y degradación de nucleótidos cíclicos, y 100 o más canales iónicos, de entre los cuales unos 20 son de entrada regulada por nucleótidos cíclicos. Se encuentran presentes inositol fosfolípidos, así como quinasas que los interconvierten por fosforilación de los grupos inositol de la cabeza.

Sin embargo, algunos tipos de proteínas de señalización comunes en tejidos animales están ausentes de las plantas o están representados sólo por unos pocos genes. Las proteína quinasas dependientes de nucleótido cíclico (PKA y PKG), por ejemplo, parecen estar ausentes. Los genes de las proteínas G heterotriméricas y de la proteína Tyr quinasa son mucho menos prominentes en el genoma de las plantas, y los genes de los GPCR, que constituyen la familia génica más abundante en el genoma humano (~1.000 genes), están muy escasamente representados en el genoma de plantas. Los receptores nucleares de esteroides de unión a DNA no son, ciertamente, prominentes y pueden estar ausentes de las plantas. Aunque los vegetales carecen del mecanismo más conservado de percepción de la luz presente en los animales (la rodopsina, con el retinal como pigmento), poseen una rica colección de otros mecanismos de detección de la luz que no se encuentran en los tejidos animales como, por ejemplo, los fotocromos y los criptocromos (Capítulo 19).

Las clases de compuestos que hacen aparecer señales en plantas son similares a ciertas moléculas señalizadoras de mamíferos (**Fig. 12–32**). En lugar de prostaglandinas, las plantas tienen jasmonato, y en lugar de hormonas esteroideas, tienen brasinosteroides. Alrededor de 100 péptidos pequeños diferen-

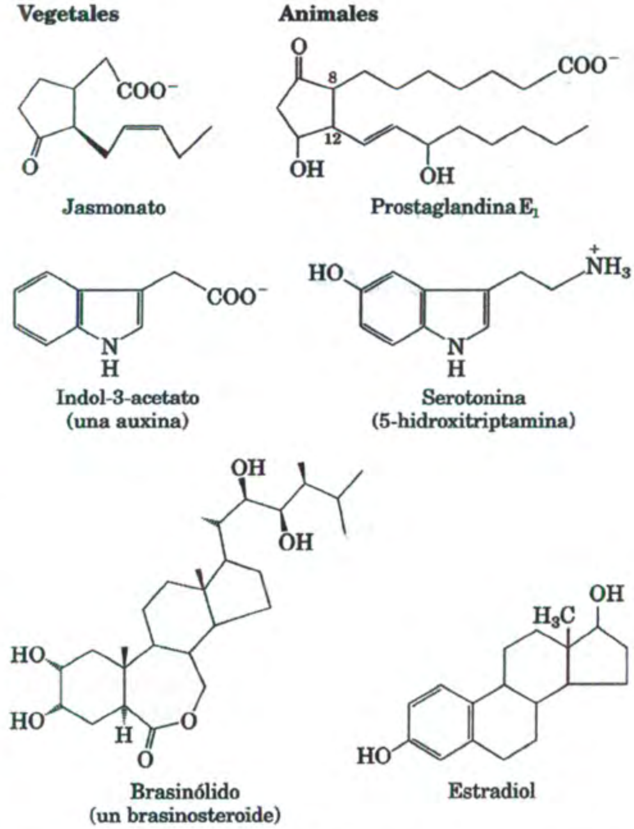


FIGURA 12–32 Similitudes estructurales entre señales de plantas y animales.

tes actúan como señales en plantas y tanto las plantas como los animales utilizan compuestos derivados de aminoácidos aromáticos como señales.

Las plantas detectan etileno a través de un sistema de dos componentes y una cascada MAPK

La hormona vegetal gaseosa etileno ($CH_2{=}CH_2$), que estimula la maduración de los frutos (entre otras funciones), actúa a través de receptores que están relacionados por su secuencia primaria con los receptores His quinasa de los sistemas bacterianos de dos componentes, y probablemente evolucionaron a partir de ellos. En *Arabidopsis thaliana*, el sistema de señalización de dos componentes está contenido en una sola proteína integral de membrana del retículo endoplasmático (*no* la membrana plasmática). El etileno difunde al interior de la célula a través de la membrana plasmática y se dirige al RE. El primer componente secuencial afectado por la señalización debida al etileno es una proteína Ser/Thr quinasa (CTR1; **Fig. 12–33**) con homología de secuencia con Raf, la proteína quinasa que inicia la cascada MAPK en los mamíferos en respuesta a la insulina (véase la Fig. 12–15). En vegetales, en ausencia de etileno, la CTR1 quinasa es activa e *inhibe* la cascada MAPK, impidiendo la transcripción de los genes de respuesta al etileno. La exposición al etileno *inactiva* la CTR1 quinasa, activando así la cascada MAPK que lleva a la activación del factor de transcripción EIN3. El EIN3 activo estimula la síntesis de un segundo factor de transcripción (ERF1), que a su vez activa la transcripción de los genes de respuesta al etileno; los productos génicos afectan a procesos que van desde el desarrollo de plántulas a la maduración de frutos. Aunque aparentemente procede del sistema de señalización de dos componentes bacterianos, el sistema del etileno en *Arabidopsis* es diferente en el sentido que la actividad His quinasa que define al componente 1 en bacterias no es esencial para la transducción de señal en *Arabidopsis*.

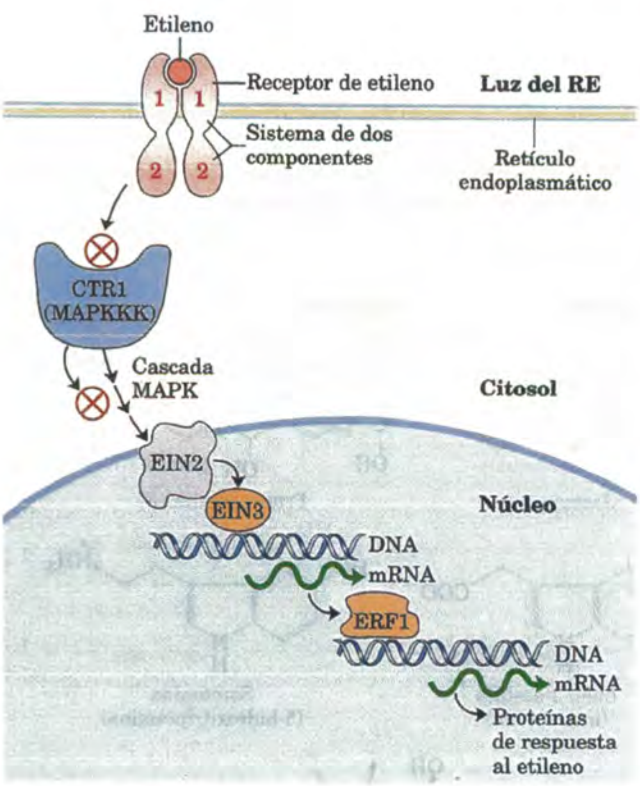


FIGURA 12–33 Mecanismo de transducción para la detección del etileno por las plantas. El receptor de etileno (rosa) del retículo endoplasmático es un sistema de dos componentes contenido dentro de una sola proteína que tiene un dominio receptor (componente 1) y un dominio de regulación de respuesta (componente 2). El receptor controla (de una manera que todavía no está clara) la actividad de CTR1, una proteína quinasa similar a las MAPKKK y, por tanto, se supone que es parte de una cascada MAPK. CTR1 es un regulador negativo de la respuesta del etileno; cuando CTR1 es *inactivo*, la señal del etileno pasa a través del producto génico EIN2 (se cree que es una proteína de la cubierta nuclear), que incrementa la síntesis de ERF1, un factor de transcripción. ERF1 estimula la expresión de proteínas específicas de la respuesta al etileno.

Proteína quinasas tipo receptor transducen señales de péptidos y brasinosteroides

Un motivo común de la señalización en vegetales implica **quinasas tipo receptor (RLK)** con un único segmento helicoidal en la membrana plasmática que conecta un dominio receptor en el exterior con una proteína Ser/Thr quinasa en el lado citoplasmático. Este tipo de receptor participa en el mecanismo de defensa desencadenado por la infección con un patógeno bacteriano **(Fig. 12–34a)**. La señal para activar los genes necesarios para la defensa contra la infección es un péptido (flg22) liberado por la degradación de flagelina, que es la proteína principal del flagelo bacteriano. La unión de flg22 al receptor FLS2 de *Arabidopsis thaliana* induce la dimerización del receptor y la autofosforilación en residuos Ser y Thr, mientras que el efecto a lo largo de la ruta es la activación de una cascada MAPK como la descrita anteriormente para la acción de la insulina (Fig. 12–15). La quinasa final de esta cascada activa un factor de transcripción específico que desencadena la síntesis de las proteínas que defienden contra la infección bacteriana. Se desconocen todavía los pasos entre la fosforilación del receptor y la cascada MAPK. Una fosfoproteína fosfatasa (KAPP) se asocia con la proteína del receptor activo y lo inactiva por desfosforilación para detener la respuesta.

La cascada MAPK en la defensa de los vegetales contra los patógenos bacterianos es notablemente similar a la respuesta inmune innata en los mamíferos (Fig. 12–34b) que es provocada por el lipopolisacárido bacteriano y en la que intervienen los receptores de tipo Toll (TLR, nombre derivado de un mutante de *Drosophila* denominado originalmente Toll que significa "loco" en alemán); los TLR se encontraron con posterioridad en otros muchos organismos, demostrándose que funcionan en el desarrollo embrionario.

Otros receptores de membrana utilizan mecanismos similares para activar una cascada MAPK, que activa en último término factores de transcripción que ponen en funcionamiento los genes esenciales para la respuesta de defensa.

Se supone que la mayoría de los varios centenares de RLK vegetales actúan de forma similar: la unión del ligando induce dimerización y autofosforilación, mientras que la receptor quinasa provoca respuestas posteriores en la vía por fosforilación de proteínas clave en residuos Ser o Thr.

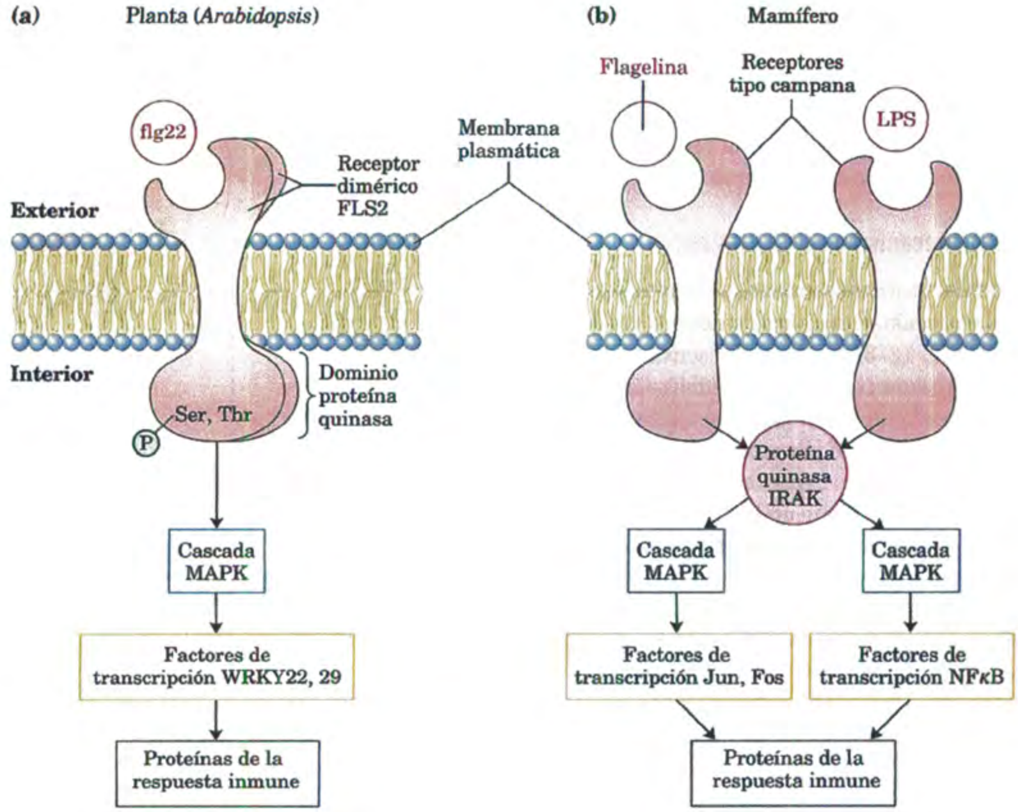


FIGURA 12–34 Similitudes entre las rutas de señalización que desencadenan respuestas inmunes en vegetales y animales. **(a)** En la planta *Arabidopsis thaliana*, el péptido flg22, procedente de los flagelos de una bacteria patógena, se une a su receptor (FLS) de la membrana plasmática haciendo que los receptores formen dímeros y desencadenando la autofosforilación del dominio proteína quinasa citosólico en un residuo Ser o Thr (*no* una Tyr). Así activada, la proteína quinasa fosforila a otras proteínas que actúan más adelante en la ruta (no mostradas). El receptor activado también activa (no se sabe de qué manera) una cascada MAPK que lleva a la fosforilación de una proteína nuclear que normalmente inhibe los factores de transcripción WRKY22 y 29; esta fosforilación provoca la degradación proteolítica del inhibidor y libera los factores de transcripción que estimulan la expresión génica relacionada con la respuesta inmune. **(b)** En los mamíferos, un lipopolisacárido bacteriano tóxico (LPS; véase la Fig. 7–30) es detectado por receptores de la membrana plasmática que seguidamente se asocian con una proteína quinasa soluble (IRAK), activándola. La proteína flagelar principal de la bacteria patógena actúa a través de un receptor similar activando también IRAK. La IRAK activada inicia dos cascadas MAPK diferentes que acaban en el núcleo, donde se sintetizan las proteínas necesarias para la respuesta inmune. Jun, Fos y NFκB son factores de transcripción.

RESUMEN 12.9 Señalización en microorganismos y plantas

- Las bacterias y los microorganismos eucarióticos tienen diversos sistemas sensoriales que les permiten analizar su entorno y responder de forma efectiva al mismo. En el sistema de dos componentes, una receptor His quinasa percibe la señal y se autofosforila en un residuo His; a continuación fosforila un residuo de Asp del regulador de respuesta.
- Los vegetales responden a muchos estímulos ambientales empleando hormonas y factores de crecimiento para coordinar el desarrollo y las actividades metabólicas de sus tejidos. Los genomas de plantas codifican centenares de proteínas de señalización, entre ellas algunas muy parecidas a las de los mamíferos.
- Mecanismos de señalización de dos componentes comunes en bacterias se encuentran en forma modificada en las plantas; se utilizan en la detección de señales químicas y lumínicas.
- Las quinasas tipo receptor (RLK) de vegetales participan en la detección de una amplia gama de estímulos, incluidos los brasinosteroides, péptidos que se originan en patógenos, y las señales de desarrollo. Las RLK autofosforilan residuos Ser/Thr y a continuación activan proteínas posteriores dentro de la ruta, que en algunos casos son cascadas MAPK. El resultado final es un incremento en la transcripción de genes específicos.

12.10 Transducción sensorial en la vista, el olfato y el gusto

La detección de la luz, los olores y los sabores (vista, olfato y gusto, respectivamente) en animales se lleva a cabo por neuronas sensoriales especializadas que utilizan mecanismos de transducción de señal similares a los utilizados para detectar hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento. Una señal senso-

rial inicial se amplifica a gran escala gracias a mecanismos en los que intervienen canales iónicos de entrada regulada y segundos mensajeros intracelulares; el sistema se adapta a la estimulación continua mediante cambios en la sensibilidad a los estímulos (desensibilización); la entrada sensorial de varios receptores se integra antes de que la señal final llegue al cerebro.

El sistema visual utiliza mecanismos GPCR clásicos

En el ojo de los vertebrados, la luz que entra a través de la pupila se enfoca sobre una colección de neuronas sensibles a la luz altamente organizadas **(Fig. 12–35)**. Las células sensibles a la luz son de dos tipos: los bastones (unos 10^9 por retina), los cuales son sensibles a bajos niveles de luz pero que no discriminan los colores, y los conos (unos 3×10^6 por retina), que son menos sensibles a la luz pero que tienen capacidad de discriminar los colores. Ambos tipos celulares son neuronas sensoriales especializadas largas y estrechas con dos compartimientos celulares diferentes: el segmento externo contiene docenas de discos membranosos cargados con la proteínas receptoras y su cromóforo retinal, mientras que el segmento interno contiene el núcleo y muchas mitocondrias, que producen el ATP esencial para la fototransducción.

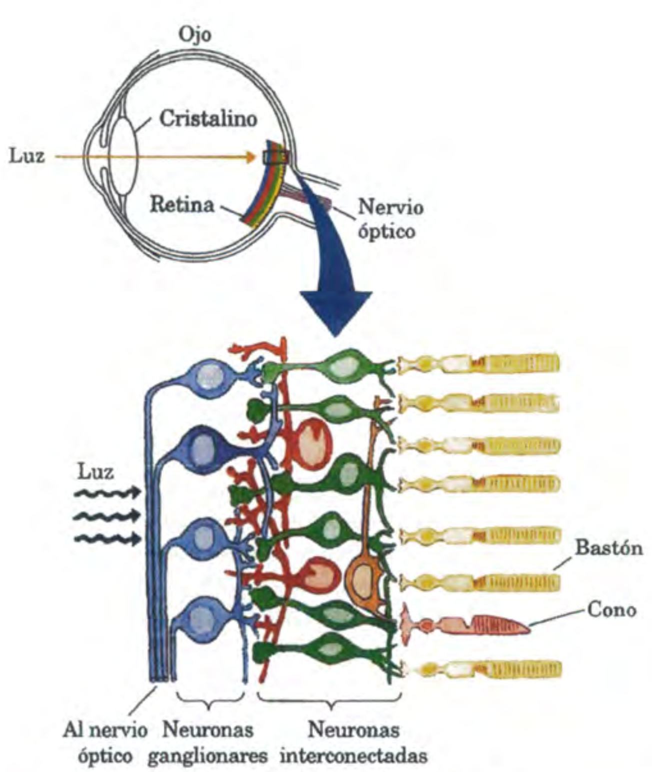


FIGURA 12–35 Recepción de la luz en el ojo de vertebrados. El cristalino del ojo focaliza la luz en la retina, que está compuesta por capas de neuronas. Las neuronas fotosensoras primarias son bastones (amarillo), responsables de la alta resolución y de la visión nocturna, y los conos de tres subtipos (rosa), que inician la visión del color. Los bastones y conos forman sinapsis con varias hileras de neuronas interconectoras que transmiten e integran las señales eléctricas. Finalmente las señales pasan de las neuronas ganglionares al cerebro a través del nervio óptico.

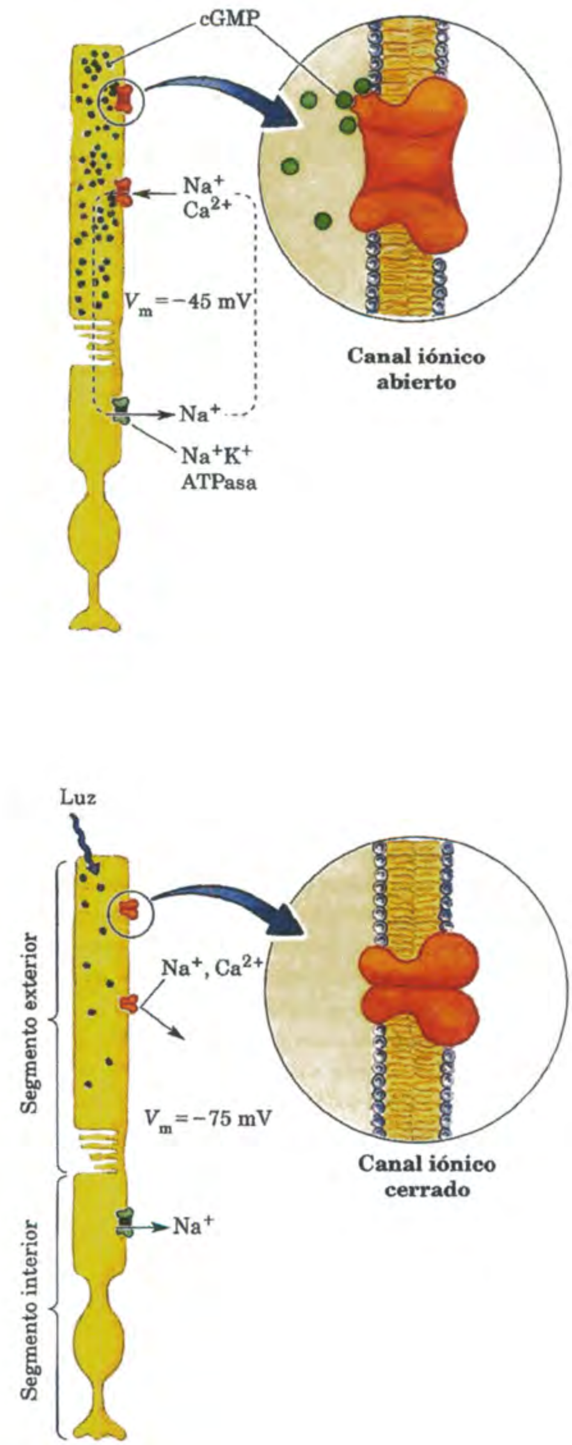


FIGURA 12–36 Hiperpolarización de los bastones inducida por luz. El bastón está formado por un segmento externo, lleno de pilas de discos membranosos (no mostrados) que contienen el fotorreceptor rodopsina, y un segmento interno que contiene el núcleo y otros orgánulos (aquí no mostrados). Los conos tienen una estructura similar. El ATP en el segmento interno acciona la Na^+K^+ ATPasa, que crea un potencial eléctrico transmembrana al bombear 3 Na^+ hacia fuera por cada 2 K^+ que bombea hacia dentro. El potencial de membrana se reduce por el flujo de Na^+ y de Ca^{2+} al interior de la célula a través de canales catiónicos de entrada regulada por cGMP en la membrana plasmática del segmento externo. Cuando la rodopsina absorbe luz, provoca la degradación de cGMP (puntos verdes) en el segmento externo, provocando el cierre del canal iónico. Sin entrada de cationes a través de este canal, la célula se hiperpolariza. Esta señal eléctrica pasa al cerebro a través de hileras de neuronas mostradas en la Figura 12–35.

Al igual que otras neuronas, los bastones y los conos tienen un potencial eléctrico transmembrana (V_m) producido por el bombeo electrogénico de la Na^+K^+ ATPasa de la membrana plasmática del segmento interno **(Fig. 12–36)**. También contribuye al potencial de membrana un canal iónico en el segmento externo que permite el paso de Na^+ o de Ca^{2+} y que se abre gracias al cGMP. En la oscuridad, los bastones contienen suficiente cGMP para mantener este canal abierto. El potencial de membrana viene determinado, por tanto, por la diferencia entre el Na^+ y el K^+ bombeados por el segmento interno (que polariza la membrana) y el flujo hacia el interior de Na^+ a través de los canales iónicos del segmento exterior (que tiende a despolarizar la membrana).

La esencia de la señal en el bastón retinal o en el cono es un descenso de la [cGMP] inducido por la luz, que provoca el cierre del canal iónico regulado por el cGMP. La membrana plasmática se hiperpolariza entonces gracias a la Na^+K^+ ATPasa. Los bastones y conos realizan la sinapsis con las neuronas interconectadas (Fig. 12–35) que transportan información sobre la actividad eléctrica a las neuronas ganglionares cerca de la superficie interna de la retina.

Las neuronas ganglionares integran la acción de muchos bastones o conos y envían la señal resultante a través del nervio óptico hasta el córtex visual del cerebro.

La transducción visual comienza cuando la luz incide sobre la rodopsina, de la que miles de moléculas están presentes en cada uno de los discos del segmento externo de bastones y conos. La **rodopsina** (M_r 40.000) es una proteína integral con siete hélices α transmembrana **(Fig. 12–37)**, con la arquitectura característica de los GPCR. El pigmento que absorbe la luz (cromóforo) **11-*cis*-retinal** está unido covalentemente a la **opsina,** el componente proteico de la rodopsina, a través de una base de Schiff a un residuo Lys.

La molécula de retinal se encuentra cerca del centro de la bicapa (Fig. 12–37), orientada con su eje longitudinal aproximadamente en el plano de la membrana. Cuando el componente retinal de la rodopsina absorbe un fotón, la energía provoca un cambio fotoquímico; el 11-*cis*-retinal se convierte en **todo-*trans*-retinal** (véanse las Figs. 1–18b y 10–21). Este cambio en la estructura del cromóforo provoca cambios de conformación en la molécula de rodopsina. Éste es el primer paso en la transducción visual.

El retinal proviene de la vitamina A_1 (retinol), que se produce a partir del β-caroteno (véase la Fig. 10–21). La deficiencia de vitamina A en la dieta da lugar a la ceguera nocturna (incapacidad de adaptarse a bajos niveles lumínicos), que es común en algunos países en desarrollo. El suplemento con vitamina A o vegetales ricos en caroteno (tales como las zanahorias) suministran la vitamina e invierten los efectos de la ceguera nocturna. ■

La rodopsina excitada actúa a través de la proteína G transducina reduciendo la concentración de cGMP

En su conformación excitada, la rodopsina interacciona con una segunda proteína, la **transducina,** que se encuentra cerca en la cara citosólica de la membrana del disco (Fig. 12–37). La transducina (T) pertenece a la misma familia de proteínas heterotriméricas de unión de GTP que G_s y G_i. Aunque especializada para la transducción visual, la transducina comparte muchas características funcionales con G_s y G_i. Puede unir tanto GDP como GTP. En la oscuridad, se une GDP, las tres subunidades de la proteína (T_α, T_β y T_γ) permanecen unidas y no se envía señal. Cuando la rodopsina se excita por la luz, interacciona con la transducina y cataliza el cambio de GDP por GTP del citosol **(Fig. 12–38**, pasos ① y ②). La transducina se disocia a continuación en T_α y $T_{\beta\gamma}$, y el T_α-GTP transporta la señal desde el receptor excitado al siguiente elemento en la ruta de la transducción, una cGMP fosfodiesterasa; este enzima convierte el cGMP en 5′-GMP (pasos ③ y ④). Observe que ésta no es la misma nucleótido cíclico fosfodiesterasa que hidroliza cAMP para terminar la respuesta β-adrenérgica. Una isoforma de la PDE específica de cGMP se encuentra sólo en las células visuales de la retina.

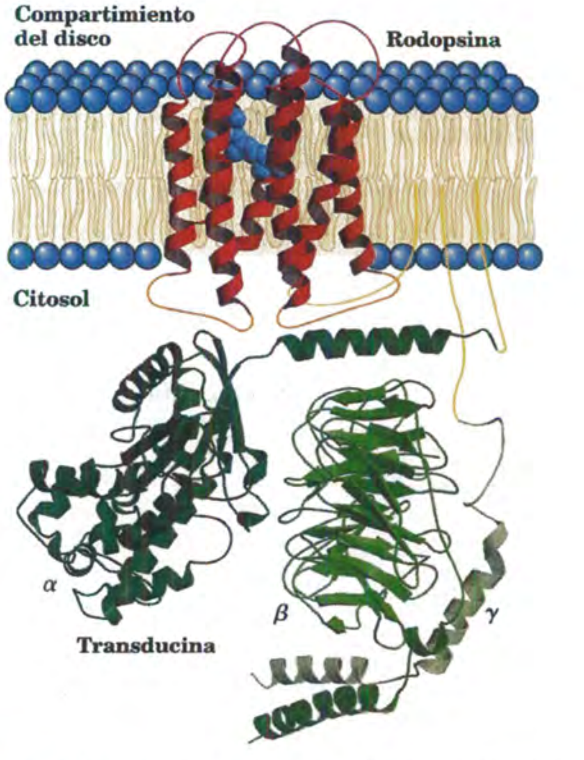


FIGURA 12–37 Complejo de la rodopsina con la proteína G transducina. (PDB ID 1BAC) La rodopsina (rojo) tiene siete hélices transmembrana incrustadas en las membranas de los discos de los segmentos externos de los bastones y está orientada con su extremo carboxilo-terminal en la cara citosólica y su extremo amino-terminal dentro del disco. El cromóforo 11-*cis*-retinal (estructura de modelo espacial azul), unido a través de un enlace por base de Schiff a la Lys^{256} de la séptima hélice, se localiza cerca del centro de la bicapa. (Esta posición es similar a la del sitio de unión de adrenalina en el receptor β-adrenérgico.) Varios residuos Ser y Thr cerca del extremo carboxilo-terminal son sustratos para fosforilaciones que son parte del mecanismo de desensibilización de la rodopsina. Los lazos citosólicos que interaccionan con la proteína G transducina se muestran en naranja; todavía no se conocen sus posiciones exactas. Las tres subunidades de transducina (verde) se muestran en su disposición probable. La rodopsina está palmitilada en su extremo carboxilo-terminal, y ambas subunidades α y γ de la transducina tienen unidos lípidos (amarillo) que les ayudan a anclarse a la membrana.

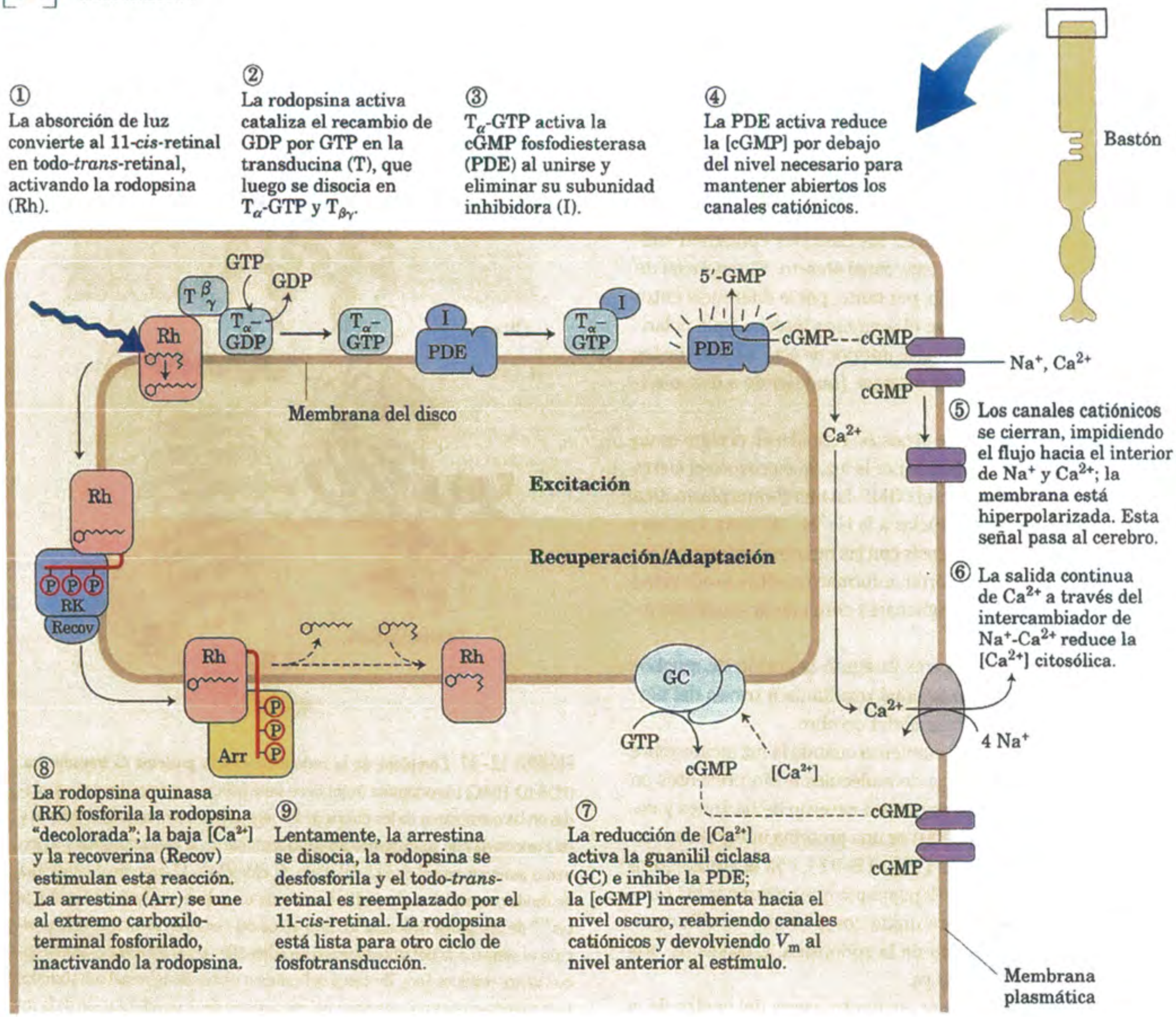


FIGURA 12–38 Consecuencias moleculares de la absorción de fotones por la rodopsina en el segmento externo de los bastones. La mitad superior de la figura (etapas de la ① a la ⑤) describe la excitación; la inferior (etapas de la ⑥ a la ⑨), la recuperación y adaptación después de la iluminación.

La PDE de la retina es una proteína integral con el sitio activo en el lado citoplasmático de la membrana del disco. En la oscuridad, una subunidad inhibidora unida fuertemente suprime la actividad de la PDE. Cuando T_α-GTP encuentra la PDE, la subunidad inhibidora abandona el enzima y en su lugar se une a T_α, de modo con lo que la actividad del enzima aumenta inmediatamente varios órdenes de magnitud. Cada molécula de PDE activa degrada muchas moléculas de cGMP a 5′-GMP, que es biológicamente inactivo, disminuyendo la [cGMP] en el segmento externo en una fracción de segundo. A la nueva [cGMP] menor, los canales iónicos de compuerta regulada por cGMP se cierran, bloqueando la reentrada de Na^+ y Ca^{2+} al segmento externo e hiperpolarizando la membrana del bastón o del cono (paso ⑤). Gracias a este proceso, el estímulo inicial, un fotón, cambia el V_m de la célula.

Varios pasos en el proceso de la transducción visual dan lugar a una gran amplificación de la señal. Cada molécula de rodopsina excitada activa al menos 500 moléculas de transducina, cada una de las cuales activa una molécula de PDE. Esta fosfodiesterasa tiene un número de recambio notablemente elevado, de tal modo que cada molécula activada hidroliza 4.200 moléculas de cGMP por segundo. La unión del cGMP a canales iónicos de compuerta regulada por cGMP es cooperativa, por lo que una variación relativamente baja de la [cGMP] da como resultado un gran cambio en la conductancia iónica. El resultado de estas amplificaciones es una sensibilidad exquisita a la luz. La absorción de un simple fotón cierra 1.000 o más canales iónicos y cambia el potencial de membrana de la célula en aproximadamente 1 mV.

La señal visual termina rápidamente

A medida que sus ojos se desplazan a lo largo de esta línea, las imágenes de las primeras palabras desaparecen rápidamente, antes de que vea la siguiente serie de palabras. En este corto intervalo, ha tenido lugar una gran cantidad de bioquímica. Muy poco después de que cese la iluminación de los bastones y conos, el sistema fotosensor se apaga. La subunidad α de la transducina (con el GTP unido) tiene una actividad GTPasa intrínseca. En unos milisegundos después de que disminuya la in-

tensidad de la luz, se hidroliza el GTP y la T_α se reasocia con la $T_{\beta\gamma}$. La subunidad inhibidora de la PDE que había estado unida a T_α-GTP se libera y se reasocia con el enzima, inhibiendo su actividad. Para devolver la [cGMP] a su nivel de "oscuridad" el enzima guanilil ciclasa convierte el GTP en cGMP (paso ⑦en la Fig. 12–38) en una reacción que se inhibe a altas [Ca^{2+}] (>100 nM). Durante la iluminación, los niveles de Ca^{2+} descienden porque la [Ca^{2+}] de estado estacionario en el segmento exterior es consecuencia del bombeo hacia el exterior de Ca^{2+} a través del intercambiador Na^+-Ca^{2+} de la membrana plasmática (véase la Fig. 12-36) y del movimiento hacia el interior de Ca^{2+} a través de canales de compuerta regulada por cGMP abiertos. En la oscuridad, esto produce una [Ca^{2+}] de aproximadamente 500 nM, suficiente para inhibir la síntesis de cGMP. Tras una breve iluminación, el Ca^{2+} entra más despacio y la [Ca^{2+}] disminuye (paso ⑥). La inhibición de la guanilil ciclasa por Ca^{2+} queda mitigada, y la ciclasa convierte GTP en cGMP para volver al sistema a su estado preestimulado (paso ⑦).

La propia rodopsina también experimenta cambios como respuesta a una iluminación prolongada. El cambio de conformación inducido por la absorción de la luz expone varios residuos Thr y Ser en el dominio carboxilo-terminal. Estos residuos se fosforilan rápidamente gracias a la **rodopsina quinasa** (paso ⑧en la Fig. 12–38), que es funcional y estructuralmente homóloga a la quinasa β-adrenérgica (βARK) que desensibiliza el receptor β-adrenérgico (Fig. 12–8). La proteína de unión a Ca^{2+} **recoverina** inhibe la rodopsina quinasa a alta [Ca^{2+}], pero la inhibición se anula cuando la [Ca^{2+}] disminuye tras la iluminación tal como se describió anteriormente. El dominio carboxilo-terminal fosforilado de la rodopsina se une a la proteína **arrestina 1,** impidiendo que continúe la interacción entre la rodopsina activada y la transducina. La arrestina 1 es homóloga cercana de la arrestina 2 (βarr; Fig. 12–8). En una escala de tiempo relativamente larga (de segundos a minutos), el todo-*trans*-retinal de una molécula de rodopsina excitada es eliminado y reemplazado por 11-*cis*-retinal, para producir rodopsina lista para otro ciclo de excitación (paso ⑨ en la Fig. 12–38).

Los conos están especializados en la visión en color

La visión en color en los conos utiliza una ruta de transducción sensorial que es esencialmente idéntica a la descrita anteriormente pero desencadenada por receptores luminosos ligeramente diferentes. Existen tres tipos de conos especializados en la detección de la luz de diferentes regiones del espectro, que utilizan tres proteínas fotorreceptoras relacionadas (opsinas). Cada cono expresa sólo una clase de opsina, pero cada tipo está estrechamente relacionado con la rodopsina en tamaño, secuencia de aminoácidos y, seguramente, en estructura tridimensional. Las diferencias entre las opsinas son, sin embargo, lo suficientemente grandes como para situar el cromóforo, 11-*cis*-retinal, en tres ambientes ligeramente diferentes, con el resultado de que los tres fotorreceptores tienen diferentes espectros de absorción **(Fig. 12–39)**. Nosotros discriminamos los colores y matices gracias a la integración de las señales de entrada de los tres tipos de conos, cada uno de los cuales contiene uno de los tres fotorreceptores.

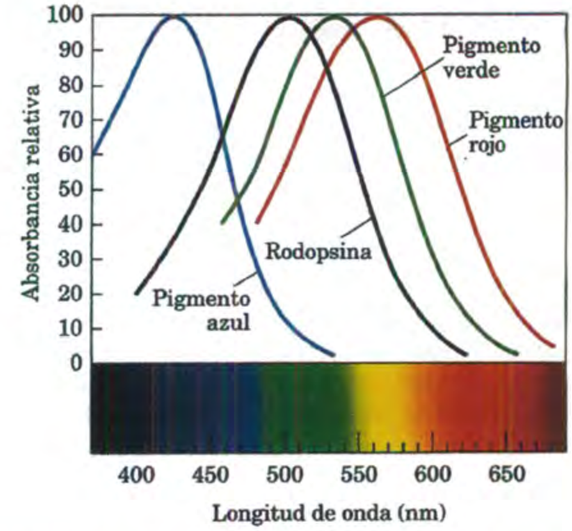


FIGURA 12–39 Espectro de absorción de rodopsina purificada y de los receptores rojo, verde y azul de los conos. El espectro, obtenido de conos individuales aislados de cadáveres, presenta picos alrededor de 420, 530 y 560 nm, mientras que el máximo de absorción para la rodopsina está sobre unos 500 nm. Como referencia, el espectro visible para los humanos está entre unos 380 y 750 nm.

La ceguera para los colores, tal como la incapacidad de distinguir el rojo del verde, es un rasgo hereditario bastante común en humanos. Los tipos diferentes de ceguera para los colores son el resultado de diferentes mutaciones de las opsinas. Una forma es debida a la pérdida del fotorreceptor rojo; los individuos afectados se conocen como **dicromáticos rojos⁻** (sólo pueden ver dos colores primarios). Otros carecen del pigmento verde y son **dicromáticos verdes⁻**. En algunos casos, los fotorreceptores rojo y verde están presentes pero tienen la secuencia de aminoácidos cambiada, lo que provoca un cambio en su espectro de absorción y, en consecuencia, una visión con color anormal. Según sea el pigmento alterado, tales individuos se denominan **tricromáticos anómalos rojos** o **tricromáticos anómalos verdes.** El examen de los genes de los receptores visuales ha permitido el diagnóstico de ceguera para el color en un "paciente" famoso ¡más de un siglo después de su muerte! (Recuadro 12–4). ■

El olfato y el gusto en vertebrados utilizan mecanismos similares al sistema visual

Las células sensoriales utilizadas para detectar olores y sabores tienen mucho en común con los conos y bastones. Las neuronas olfativas tienen un conjunto de cilios largos y estrechos que se extienden desde un extremo de la célula a la capa mucosa que la recubre. Estos cilios presentan una gran área superficial para la interacción con las señales olfativas. Los receptores de los estímulos olfativos son proteínas de la membrana ciliar con la estructura familiar GPCR de siete hélices α transmembrana. La señal olfativa puede ser cualquiera de los muchos compuestos volátiles para los que existen proteínas receptoras específicas. Nuestra capacidad para discriminar olores depende de muchos centenares de receptores olfativos diferentes en la lengua y en el tramo nasal, así como de la capacidad del cerebro para integrar la entrada procedente de los diferentes tipos de receptores

RECUADRO 12–4 MEDICINA Daltonismo: experimento de John Dalton desde la tumba

El químico John Dalton (famoso por la teoría atómica) tenía ceguera para los colores (daltonismo). Pensó que probablemente el humor vítreo de sus ojos (el fluido que llena el globo ocular detrás del cristalino) estaba teñido de azul, a diferencia de la falta de color encontrada en los ojos normales. Propuso que después de su muerte sus ojos fueran diseccionados y se determinara el color del humor vítreo. Su deseo fue satisfecho; el día después de su muerte acaecida en julio de 1844, Joseph Ransome diseccionó sus ojos y encontró que el humor vítreo era absolutamente incoloro. Ransom, como muchos otros científicos, se mostró reticente a tirar las muestras. Colocó los ojos de Dalton en un recipiente con conservante (Fig. 1), donde permanecieron durante un siglo y medio.

A mediados de la década de 1990, biólogos moleculares de Inglaterra tomaron pequeñas muestras de las retinas de Dalton y extrajeron su DNA. Usando las secuencias génicas conocidas de las opsinas de los receptores rojo y verde, amplificaron las secuencias pertinentes (utilizando técnicas descritas en el Capítulo 9) y determinaron que Dalton tenía el gen de la opsina para el fotopigmento rojo pero carecía del gen de la opsina para el fotopigmento verde. Dalton era un dicromático verde⁻. De este modo, ciento cincuenta años después de su muerte, concluyó el experimento que comenzó Dalton con una hipótesis sobre la causa de su ceguera para los colores.

FIGURA 1 Los ojos de Dalton

olfativos para reconocer un patrón "híbrido", que amplía nuestra gama de discriminación más allá del número de receptores.

El estímulo olfativo llega a las células sensoriales por difusión a través del aire. En la capa mucosa que recubre las neuronas olfativas, la molécula olorosa se une directamente a un receptor olfativo o a una proteína de unión específica que transporta la molécula olorosa a un receptor **(Fig. 12–40)**. La interacción entre la molécula olorosa y el receptor provoca un cambio de conformación del receptor que da lugar al reemplazo del GDP unido por GTP en una proteína G, G_{olf}, análoga a la transducina y a la G_s del sistema β-adrenérgico. La G_{olf} activada activa entonces la adenilil ciclasa de la membrana ciliar, que sintetiza cAMP a partir de ATP, aumentando la [cAMP] local. Los canales de Na^+ y Ca^{2+} de compuerta regulada por cAMP

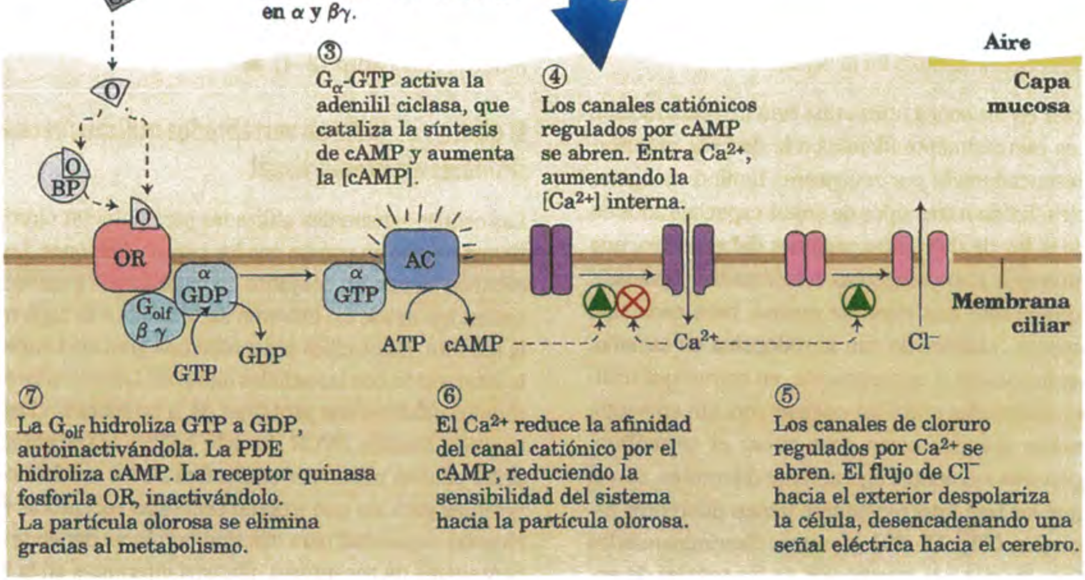


FIGURA 12–40 Procesos moleculares en el olfato. Estas interacciones suceden en los cilios de las células receptoras olfativas.

de la membrana ciliar se abren, y el flujo hacia el interior de Na^+ y de Ca^{2+} produce una pequeña despolarización denominada **potencial de receptor.** Si se unen suficientes moléculas olorosas a receptores, el potencial de receptor es lo suficientemente fuerte como para provocar que la neurona dispare un potencial de acción. Esto se traslada al cerebro en varios pasos y se registra como un olor específico. Todos estos acontecimientos tienen lugar en 100 a 200 ms.

Cuando el estímulo ya no está presente, la maquinaria de transducción se autoanula de diversas maneras. Una cAMP fosfodiesterasa devuelve la [cAMP] a los niveles preestímulo. G_{olf} hidroliza su GTP unido a GDP, inactivándose a sí misma. La fosforilación del receptor por una quinasa específica impide su interacción con G_{olf} mediante un mecanismo análogo al usado para desensibilizar el receptor β-adrenérgico y la rodopsina. Finalmente, algunas sustancias olorosas son destruidas enzimáticamente por oxidasas.

El sentido del gusto en los vertebrados refleja la actividad de neuronas gustativas agrupadas en las papilas gustativas de la superficie de la lengua. En estas neuronas sensoriales, se acoplan receptores GPCR a la proteína G heterotrimérica **gustducina** (muy similar a la transducina de los bastones y conos). Las moléculas de sabor dulce son las que se unen a receptores de las papilas gustativas "dulces". Cuando se une la molécula (el saborizante), la gustducina se activa gracias al reemplazo del GDP unido por GTP, lo que estimula la producción de cAMP por la adenilil ciclasa. El aumento resultante de la [cAMP] activa la PKA que fosforila canales de K^+ de la membrana plasmática, cerrándolos. El flujo reducido de K^+ hacia el exterior despolariza la célula **(Fig. 12–41)**. Otras papilas gustativas especializadas en la detección del sabor amargo, agrio, salado y umami utilizan diversas combinaciones de segundos mensajeros y de canales iónicos en los mecanismos de transducción.

Los GPCR de los sistemas sensoriales comparten diversas características con los GPCR de los sistemas de señalización hormonal

Hemos visto varios sistemas de señalización (hormonal, vista, olfato y gusto) en los que los receptores de membrana están acoplados a través de proteínas G a enzimas que generan segundos mensajeros. Parece claro que los mecanismos de señalización han de haber surgido en los comienzos de la evolución; estudios genómicos muestran la presencia de centenares de genes que codifican GPCR en vertebrados, en artrópodos (*Drosophila* y mosquito) y en el gusano *Caenorhabditis elegans*. Incluso la levadura de panificación común *Saccharomyces cerevisae* utiliza GPCR y proteínas G para detectar el tipo opuesto para el apareamiento. Los patrones generales se han conservado, mientras que la introducción de variaciones ha conferido a los organismos modernos la capacidad de respuesta a una amplia gama de estímulos (Tabla 12–8). De los aproximadamente 29.000 genes del genoma humano, unos 1.000 codifican GPCR, incluidos centenares para estímulos olfativos y muchos "receptores huérfanos" de los que no se conocen todavía sus ligandos naturales.

Todos los sistemas de transducción de señal bien estudiados que actúan a través de proteínas G heterotriméricas comparten algunas características comunes que reflejan su relación evolutiva **(Fig. 12–42)**. Los receptores tienen siete segmentos transmembrana, un dominio (generalmente el bucle entre las hélices 6 y 7) que interacciona con una proteína G, y un dominio citoplasmático en el extremo carboxilo-terminal que experimenta la fosforilación reversible de varios residuos Ser o Thr. El

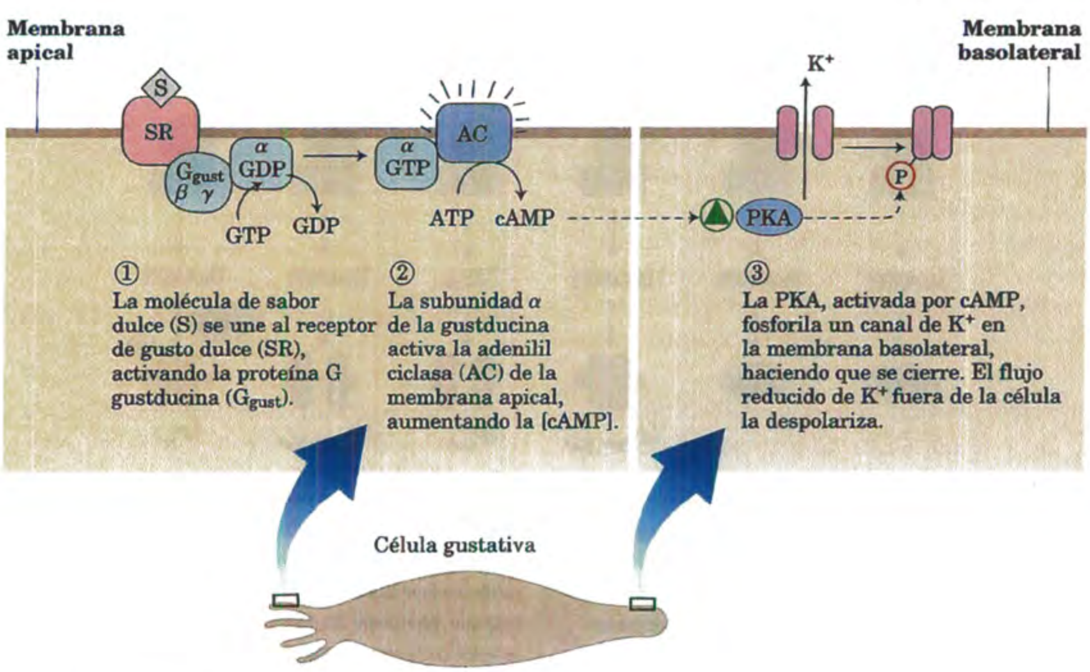


FIGURA 12–41 Mecanismo de transducción para los saborizantes dulces.

TABLA 12–8 Algunas señales transducidas por GPCR

Acetilcolina (muscarínico)	Factores de acoplamiento de levaduras	Luz
Adenosina	GABA (ácido γ-aminobutírico)	Melatonina
AMP cíclico (*Dictyostelium discoideum*)	Glucagón	Opioides
Angiotensina	Glutamato	Oxicitona
ATP (extracelular)	Histamina	Partículas olorosas
Bradiquinina	Hormona estimuladora del folículo (FSH)	Péptido intestinal vasoactivo
Calcitonina	Hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH)	Prostaglandinas
Cannabinoides	Hormona liberadora de tirotropina (TRH)	Saborizantes
Catecolaminas	Hormona luteinizante (LH)	Secretina
Colecistoquinina	Leucotrienos	Serotonina
Dopamina		Somatostatina
Factor activador de plaquetas		Tirotropina
Factor liberador de corticotropina (CRF)		Vasopresina

sitio de unión del ligando (o en el caso de los receptores de la luz, el receptor luminoso) está sepultado en lo profundo de la membrana y contiene residuos de varios segmentos transmembrana. La unión del ligando (o de la luz) induce un cambio de conformación en el receptor, exponiendo un dominio que puede interaccionar con una proteína G. Las proteínas G heterotriméricas activan o inhiben los enzimas efectores (adenilil ciclasa, PDE o PLC), que cambian la concentración de un segundo mensajero (cAMP, cGMP, IP_3 o Ca^{2+}). En los sistemas de detección de hormonas, el resultado final es una proteína quinasa activada que regula algunos procesos celulares gracias a la fosforilación de una proteína básica en este proceso. En las neuronas sensoriales, el resultado es el cambio del potencial de membrana y la consiguiente señal eléctrica que pasa de una neurona a otra en la ruta que conecta las células sensoriales con el cerebro.

Todos estos sistemas se autoinactivan. El GTP unido se convierte en GDP por la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G, a menudo aumentada por proteínas que activan la GTPasa (GAP) o proteínas RGS (*r*egulators of *G*-protein *s*ignaling: reguladores de la señal de proteínas G; véase la Fig. 12–5). En algunos casos, los enzimas efectores que son las dianas de la modulación por proteínas G también sirven como GAP. El mecanismo de desensibilización en el que se fosforila la región carboxilo-terminal seguida de la unión de arrestina es frecuente y podría ser, incluso, universal.

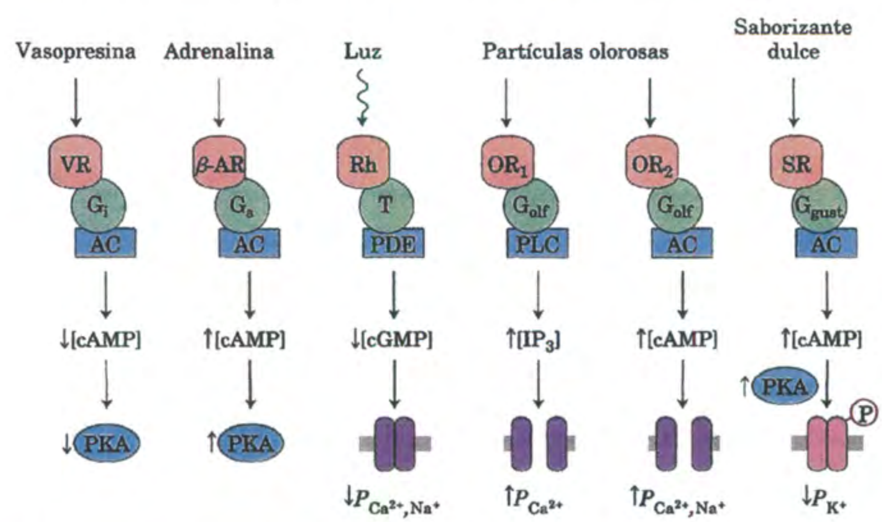


FIGURA 12–42 Características comunes de los sistemas de señalización que detectan hormonas, luz, olores y gustos. Los GPCR proporcionan una señal específica y su interacción con las proteínas G produce la amplificación de la señal. Las proteínas G heterotriméricas activan enzimas efectores: la adenilil ciclasa (AC), la fosfolipasa C (PLC) y las fosfodiesterasas (PDE) que degradan cAMP o cGMP. Los cambios en las concentraciones de los segundos mensajeros (cAMP, cGMP, IP_3) provocan alteraciones en las actividades enzimáticas por fosforilación o alteraciones en la permeabilidad (P) a Ca^{2+}, Na^+ y K^+ de las superficies de la membrana. La despolarización o hiperpolarización resultante de la célula sensorial (la señal) pasa a través de neuronas de enlace a los centros sensoriales del cerebro. En los casos mejor estudiados, la desensibilización incluye la fosforilación del receptor y la unión de una proteína (arrestina) que interrumpe las interacciones receptor–proteína G. VR representa el receptor de la vasopresina; β-AR es el receptor β-adrenérgico. Las abreviaturas de otros receptores y proteínas G son las mismas que en ilustraciones previas.

RESUMEN 12.10 Transducción sensorial en la vista, el olfato y el gusto

- La vista, el olfato y el gusto en vertebrados emplea GPCR, que actúan a través de proteínas G heterotriméricas que cambian el V_m de las neuronas sensoriales.
- En los bastones y conos de la retina, la luz activa la rodopsina, que estimula la proteína G transducina. La subunidad α liberada de la transducina activa una cGMP fosfodiesterasa, que disminuye la [cGMP] y cierra así los canales iónicos dependientes de cGMP de los segmentos externos de las neuronas. La hiperpolarización resultante en los bastones y conos transmite la señal a la siguiente neurona de la ruta y, finalmente, al cerebro.
- En las neuronas olfativas, los estímulos olfativos, que actúan a través de GPCR y proteínas G, desencadena un incremento de la [cAMP] (por activación de la adenilil ciclasa) o un aumento en la [Ca^{2+}] (por activación de la PLC). Estos segundos mensajeros actúan sobre los canales iónicos y así sobre V_m.
- Las neuronas gustativas tienen GPCR que responden a los saborizantes alterando la [cAMP] que, a su vez, modifica el V_m regulación de canales iónicos.
- Existe un alto grado de conservación de las proteínas de señalización y de los mecanismos de transducción a través de las especies.

12.11 Regulación del ciclo celular por proteína quinasas

Uno de les efectos más espectaculares de las rutas de señalización es la regulación del ciclo celular eucariótico. Durante el crecimiento embrionario, y posterior desarrollo, la división celular tiene lugar prácticamente en cada tejido. En el organismo adulto muchos tejidos se vuelven inactivos. La "decisión" de una célula de dividirse o no tiene una importancia crucial para el organismo. Cuando los mecanismos reguladores que limitan la división celular son defectuosos y las células experimentan una división incontrolada, el resultado es catastrófico: cáncer. Una correcta división celular requiere una secuencia ordenada y precisa de procesos bioquímicos que asegure a cada célula hija el conjunto completo de las moléculas que requiere para vivir. Investigaciones sobre el control de la división celular en diversas células eucarióticas han puesto de manifiesto unos mecanismos universales de regulación. Los mecanismos de señalización, muy parecidos a los antes descritos, son básicos en la determinación sobre si una célula se divide y, en caso positivo, cuándo. También aseguran el paso ordenado a través de las etapas el ciclo celular.

El ciclo celular tiene cuatro etapas

La división celular que acompaña a la mitosis en eucariotas tiene lugar en cuatro etapas bien definidas (**Fig. 12–43**). En la fase S (síntesis), el DNA se replica y produce copias para las dos células hijas. En la fase G2 (G indica el hueco, en inglés gap,

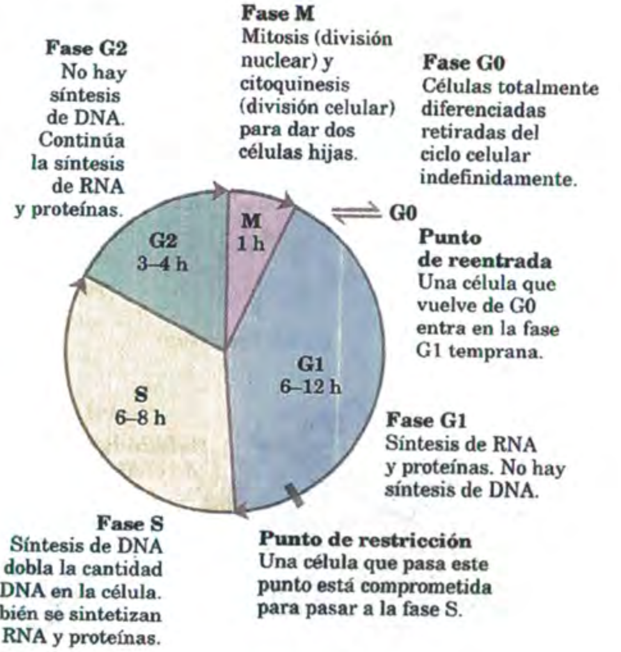


FIGURA 12–43 Ciclo celular eucariota. La duración (en horas) de las cuatro etapas varían, pero los que se muestran son típicos.

entre divisiones), se sintetizan proteínas nuevas y la célula dobla aproximadamente su tamaño. En la fase M (mitosis), la cubierta nuclear materna se rompe, los cromosomas parejos se arrastran hacia polos opuestos de la célula, cada conjunto de cromosomas hijos se rodea por una envoltura nuclear recién formada y la citoquinesis corta la célula por la mitad, produciendo dos células hijas (véase la Fig. 24–25). En el tejido embrionario o en un tejido que prolifera rápidamente cada célula hija se divide de nuevo, pero sólo después de un período de espera (G1). En cultivos de células animales, el proceso completo dura unas 24 horas.

Después del paso por mitosis y la entrada en G1, la célula o bien continúa otra división o bien cesa de dividirse, entrando en una fase de latencia (G0) que puede durar horas, días o toda la vida de la célula. Cuando una célula en G0 empieza a dividirse de nuevo, vuelve a entrar en el ciclo de división a través de la fase G1. Las células diferenciadas, tales como los hepatocitos o los adipocitos, han adquirido su función y forma especializadas; permanecen en la fase G0. Las células madre retienen su potencial de división y de diferenciación en cualquiera de ciertos tipos celulares.

Los niveles de las proteínas quinasas dependientes de ciclina experimentan oscilaciones

La sincronización del ciclo celular está controlada por una familia de proteína quinasas con actividades que cambian en respuesta a señales celulares. Al fosforilar proteínas específicas a intervalos temporales precisos, estas proteína quinasas dirigen las actividades metabólicas de la célula que producen una división celular ordenada. Estas quinasas son heterodímeros con una subunidad reguladora, **ciclina,** y una unidad catalítica, **proteína quinasa dependiente de ciclina (CDK).** En au-

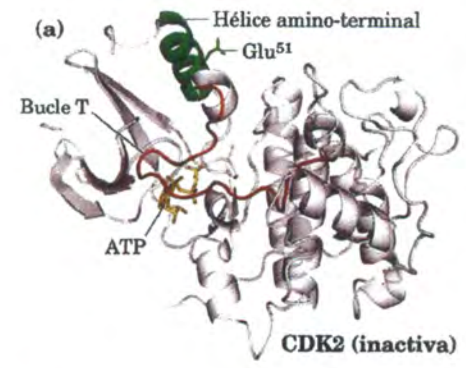
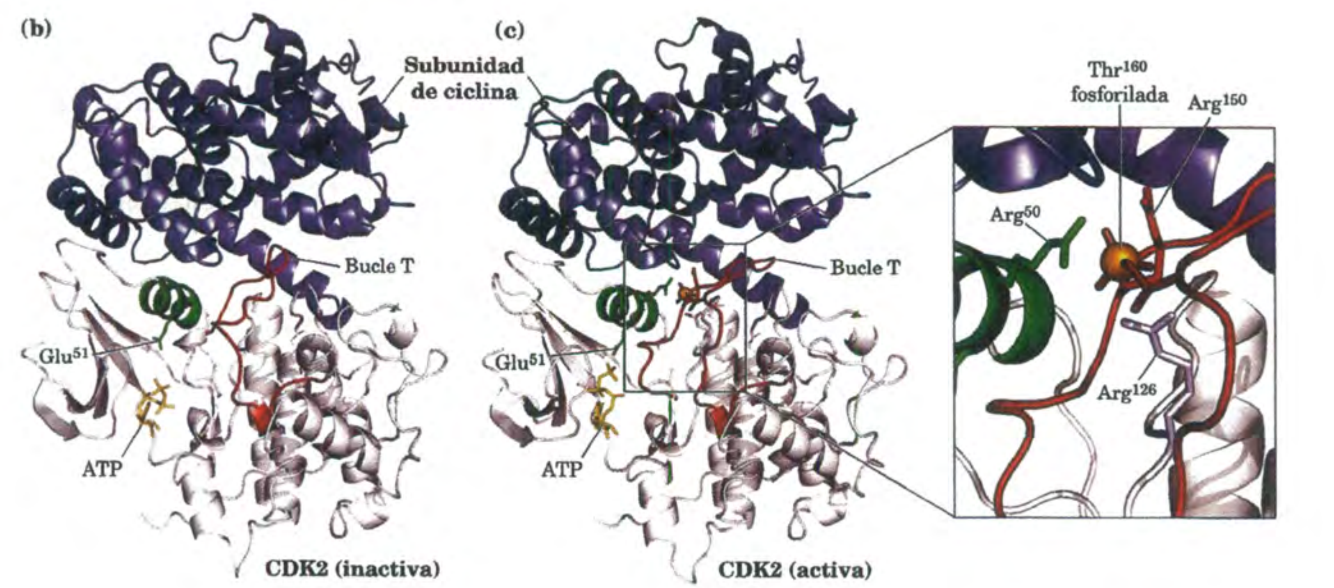


FIGURA 12–44 Activación de proteína quinasas dependientes de ciclina (CDK) por ciclina y fosforilación. Las CDK, familia de enzimas relacionados, sólo son activas cuando se asocian con ciclinas, otra familia de proteínas. En la estructura cristalina de la CDK2, con y sin ciclina, son aparentes las bases de esta activación. **(a)** Sin ciclina (PDB ID 1HCK), la CDK2 se pliega de forma que un segmento, el bucle T, obstruye el sitio de unión de la proteína sustrato y por lo tanto inhibe la actividad proteína quinasa. El sitio de unión de ATP está también cerca del bucle T. **(b)** Cuando se une la ciclina (PDB ID 1FIN), fuerza un cambio de conformación que desplaza el bucle T fuera del sitio activo y reorienta la hélice amino-terminal, llevando uno de los residuos esenciales de la catálisis (Glu^{51}) dentro del sitio activo. **(c)** La fosforilación de un residuo Thr en el bucle T produce un residuo con carga negativa que se estabiliza por la interacción con tres residuos Arg, que mantienen la CDK en su conformación activa.



sencia de ciclina, la subunidad catalítica es casi inactiva. Cuando se une ciclina, se abre el sitio catalítico, un residuo esencial para la catálisis deviene accesible **(Fig. 12–44)** y la actividad de la subunidad catalítica aumenta 10.000 veces. Las células animales tienen al menos diez ciclinas diferentes (designadas A, B y así sucesivamente) y al menos ocho CDK (desde CDK1 a CDK8), que actúan en combinaciones diversas en puntos específicos del ciclo celular. Las plantas también utilizan una familia de CDK para regular su división celular en los meristemos de la raíz y del tallo, principales tejidos en los que se da la división.

En una población de células animales sujetas a una división sincronizada, algunas actividades CDK muestran oscilaciones notables **(Fig. 12–45)**. Estas oscilaciones son el resultado de cuatro mecanismos de regulación de la actividad CDK: la fosforilación o desfosforilación de la CDK, la degradación controlada de la subunidad de ciclina, la síntesis periódica de CDK y ciclinas, y la acción de proteínas inhibidoras específicas de las CDK. En general, las CDK activas permiten que la célula entre en una fase de la división celular.

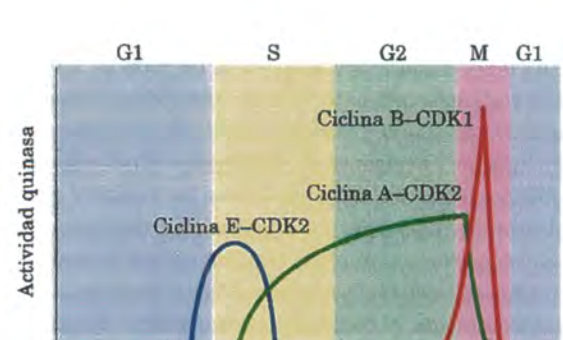


FIGURA 12–45 Variaciones de las actividades de CDK específicas durante el ciclo celular en animales. La actividad ciclina E–CDK2 presenta un máximo cerca de la unión entre las fases G1 y S, cuando el enzima activo desencadena la síntesis de los enzimas requeridos para la síntesis de DNA (véase la Fig. 12–48). La actividad ciclina A–CDK2 aumenta durante la fase S y la fase G2, y disminuye drásticamente en la fase M, coincidiendo con el máximo de B–CDK1.

Regulación de las CDK por fosforilación La actividad de una CDK se ve afectada notablemente por la fosforilación y desfosforilación de dos residuos críticos de la proteína **(Fig. 12–46a)**. La fosforilación de la Tyr^{15}, situada cerca del extremo amino-terminal, inactiva la CDK2; el residuo Ⓟ–Tyr está situado en el sitio de unión del ATP de la quinasa, y el grupo fosfato cargado negativamente bloquea la entrada de ATP. Una fosfatasa específica (una PTPasa) desfosforila este residuo Ⓟ–Tyr, permitiendo la unión de ATP. La fosforilación de la Thr^{160} en el "bucle T" de la CDK, catalizada por la quinasa activadora de la CDK, obliga al bucle T a salir de la hendidura de unión del sustrato, permitiendo la unión del sustrato y la actividad catalítica (véase la Fig. 12–44c).

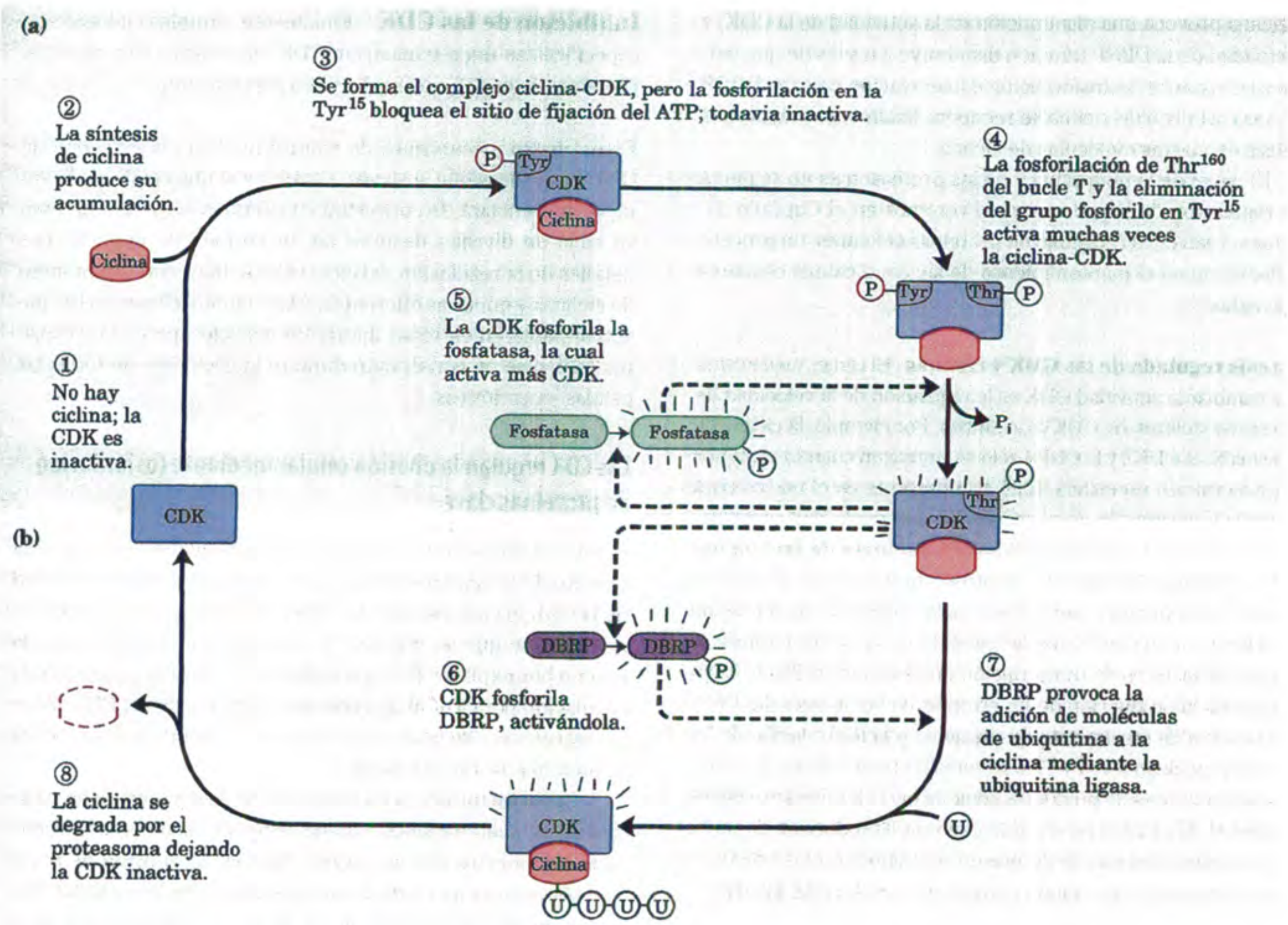


FIGURA 12–46 Regulación de CDK por fosforilación y proteólisis. **(a)** La proteína quinasa dependiente de ciclina activada en el momento de la mitosis (la CDK de la fase M) tiene un "bucle T" que puede plegarse sobre el sitio de unión a sustrato. Cuando Thr^{160} del bucle T está fosforilada, el bucle se desplaza del sitio de unión de sustrato, activando la CDK muchas veces (paso ④). **(b)** El complejo activo ciclina-CDK provoca su propia inactivación por fosforilación de DBRP (destruction box recognizing protein: proteína reconocedora de la secuencia de destrucción, paso ⑥). DBRP y la ubiquitina ligasa unen entonces varias moléculas de ubiquitina (U) a ciclina (paso ⑦), marcándola para la destrucción por proteasomas, complejos enzimáticos proteolíticos (paso ⑧).

Una circunstancia que desencadena este mecanismo de control es la presencia de cortes de cadena sencilla del DNA, que llevan a la detención del ciclo celular en G2. Una proteína quinasa específica (llamada Rad3 en levaduras), que es activada por cortes de cadena sencilla, pone en marcha una cascada que provoca la inactivación de la PTPasa que desfosforila la Tyr^{15} de la CDK. La CDK permanece inactiva y el ciclo celular se detiene en G2. La célula no se puede dividir hasta que se repara el DNA y se inviertan los efectos de la cascada.

Degradación controlada de la ciclina La degradación proteolítica de las ciclinas mitóticas, altamente específica y temporalmente precisa, regula la actividad CDK a lo largo del ciclo celular. El paso a través de la mitosis requiere primero la activación y luego la destrucción de las ciclinas A y B que activan la subunidad catalítica de la CDK de la fase M. Estas ciclinas contienen cerca del extremo amino-terminal la secuencia Arg–Thr–Ala–Leu–Gly–Asp–Ile–Gly–Asn, el "recuadro de destrucción", que actúa de marca para la degradación. (Esta utilización del término "recuadro" proviene de la práctica común, en los diagramas de secuencia de ácidos nucleicos o proteínas, de enmarcar dentro de un recuadro una secuencia corta de residuos nucleótidos o aminoácidos con una función especial. Ello no implica ninguna estructura tridimensional.) Una proteína, denominada DBRP (destruction box recognizing protein: proteína que reconoce el recuadro de destrucción), reconoce esta secuencia e inicia el proceso de degradación de la ciclina poniendo en contacto la ciclina con otra proteína, la **ubiquitina.** La ciclina y la ubiquitina activada se unen covalentemente mediante el enzima ubiquitina ligasa (Fig. 12-46b). Varias moléculas más de ubiquitina se unen entonces, proporcionando la señal para que un complejo enzimático proteolítico, el **proteasoma,** degrade la ciclina.

¿Qué es lo que controla el momento oportuno para la degradación de la ciclina? En el proceso global que se muestra en la Figura 12–46 hay un bucle de retroalimentación. El aumento en la actividad de la CDK activa la proteólisis de la ciclina. La ciclina recién sintetizada se asocia con la CKD, activándola. La CDK fosforila y activa la DBRP. La DBRP activa provoca entonces las proteólisis de la ciclina. El descenso de la concentración

de ciclina provoca una disminución en la actividad de la CDK, y la actividad de la DBRP también disminuye a través de una lenta pero constante desfosforilación e inactivación por una DBRP fosfatasa. El nivel de ciclina se recupera finalmente gracias a la síntesis de nuevas moléculas de ciclina.

El papel de la ubiquitina y de los proteasomas no se limita a la regulación de la ciclina; como veremos en el Capítulo 27, ambos actúan en el recambio de proteínas celulares, un proceso fundamental en el mantenimiento de las condiciones celulares adecuadas.

Síntesis regulada de las CDK y ciclinas El tercer mecanismo para cambiar la actividad CDK es la regulación de la velocidad de síntesis de ciclinas, de CDK o de ambas. Por ejemplo, la ciclina D, la ciclina E, la CDK2 y la CDK4 sólo se sintetizan cuando un factor de transcripción específico, E2F, está presente en el núcleo para activar la transcripción de sus genes. La síntesis de E2F es regulada por señales extracelulares tales como **factores de crecimiento** y citoquinas (señales de desarrollo que inducen la división celular), componentes esenciales para la división de las células de mamíferos en cultivo. Estos factores de crecimiento inducen la síntesis de factores de transcripción nucleares específicos, esenciales para la producción de los enzimas de las síntesis del DNA. Los factores de crecimiento desencadenan la fosforilación de las proteínas nucleares Jun y Fos, factores de transcripción que promueven la síntesis de productos génicos, entre los que se incluyen ciclinas, CDK y E2F. A su vez, E2F controla la producción de varios enzimas esenciales para la síntesis de desoxinucleótidos y de DNA, lo que permite que las células entren en la fase S **(Fig. 12–47)**.

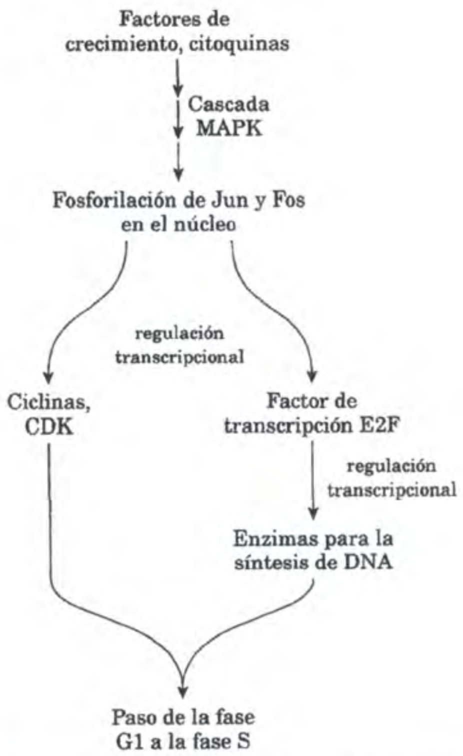


FIGURA 12–47 Regulación de la división celular por factores de crecimiento. La vía que va desde los factores de crecimiento hasta la división celular pasa a través de una cascada enzimática que activa MAPK; la fosforilación de los factores de transcripción nucleares Jun y Fos, y la actividad del factor de transcripción E2F, que promueve la síntesis de varios enzimas esenciales para la síntesis de DNA.

Inhibición de las CDK Finalmente, proteínas inhibidoras específicas se unen e inactivan CDK específicas. Una de estas proteínas es la p21, que se discutirá más adelante.

Estos cuatro mecanismos de control modulan la actividad de CDK específicas que, a su vez, controlan si una célula se dividirá, se diferenciará, se convertirá en latente o empezará un nuevo ciclo de división después de un período de latencia. Los detalles de la regulación del ciclo celular, tales como el número de ciclinas y quinasas diferentes, y las combinaciones en las que actúan, difieren entre las diferentes especies, pero el mecanismo básico se ha conservado durante la evolución de todas las células eucarióticas.

Las CDK regulan la división celular mediante fosforilación de proteínas clave

Hemos examinado de qué modo la célula mantiene un control estricto de la actividad CDK, pero ¿cómo controla la actividad de la CDK el ciclo celular? La lista de proteínas diana sobre las que se sabe que actúan las CDK continúa creciendo y queda mucho por explicar. Pero podemos ver un patrón general en la regulación por CDK al inspeccionar el efecto de las CDK sobre las estructuras de la lámina y la miosina y sobre la actividad de la proteína del retinoblastoma.

La estructura de la envoltura nuclear se mantiene en parte gracias a la alta organización de redes de filamentos intermedios compuestos por la proteína lamina. La ruptura de la envoltura nuclear antes de la segregación de las cromátidas hermanas en la mitosis se debe, en parte, a la fosforilación de la lámina por una CDK, que provoca la despolarización de los filamentos de lamina.

Una segunda diana de la quinasa es la maquinaria contráctil (actina y miosina) impulsada por ATP, que pinza una célula en división en dos partes iguales durante la citoquinesis. Después de la división, la CDK fosforila una pequeña subunidad reguladora de la miosina, hecho que provoca la disociación de la miosina de los filamentos de actina e inactiva la maquinaria contráctil. Seguidamente la desfosforilación permite la reformación del aparato contráctil para la siguiente ronda de citoquinesis.

Un tercer y muy importante sustrato de la CDK es la **proteína del retinoblastoma, pRB,** que participa en el mecanismo que detiene la división celular en G1 si se detecta una lesión en el DNA **(Fig. 12–48)**. Denominada así por la línea celular de un tumor de retina en que fue descubierta, pRb funciona en la mayoría, quizá en todos, los tipos celulares, regulando la división celular en respuesta a una serie de estímulos. La pRb no fosforilada se une al factor de transcripción E2F; mientras está unido a pRb, E2F no puede promover la transcripción de un grupo de genes necesarios para la síntesis del DNA (los genes de la DNA polimerasa α, la ribonucleótido reductasa y otras proteínas; véase el Capítulo 25). En este estado el ciclo celular no puede pasar de G1 a la fase S, el paso que compromete la célula hacia la mitosis y la división celular. El mecanismo de bloqueo de pRb-E2F se elimina cuando la pRb se fosforila gracias a la ciclina E–CDK2, lo que ocurre como respuesta a una señal para que continúe la división celular.

Cuando las proteína quinasas ATM y ATR detectan lesiones en el DNA (puestas de manifiesto por la presencia de la pro-

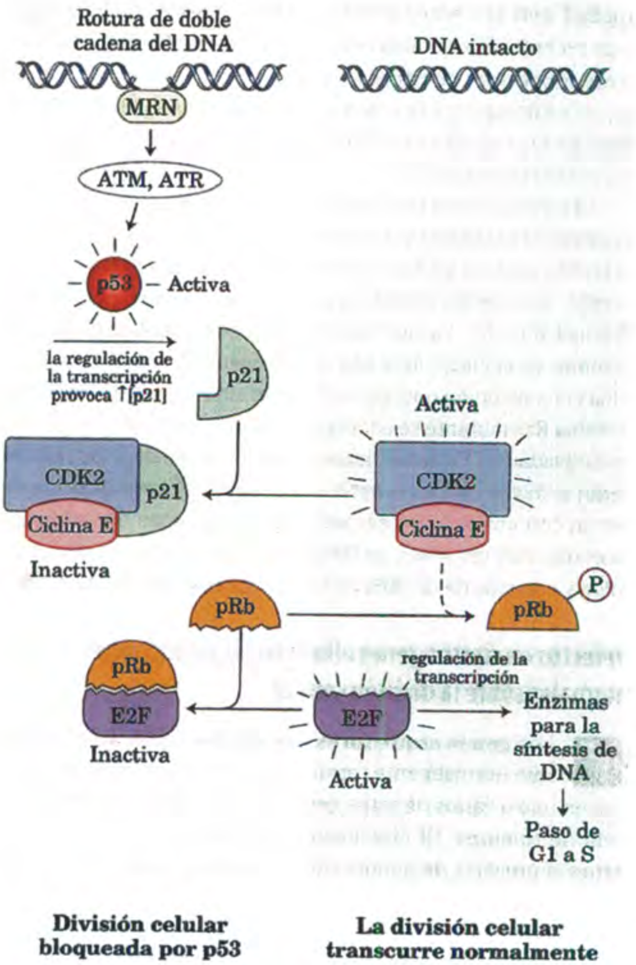


FIGURA 12–48 Regulación del paso de G1 a S por fosforilación de pRb. El factor de transcripción E2F promueve la transcripción de genes de ciertos enzimas esenciales en la síntesis de DNA. La proteína del retinoblastoma, pRb, puede unirse a E2F (parte inferior izquierda) inactivándolo e impidiendo la transcripción de estos genes. La fosforilación de pRb por CDK2 impide que se una a E2F para inactivarlo, con lo que se transcriben los genes y se permite la división celular. La lesión del DNA celular (parte superior izquierda) provoca una serie de acontecimientos que inactivan CDK2, bloqueando la división celular. Cuando la proteína MRN detecta una lesión en el DNA, activa dos proteína quinasas, ATM y ATR, que fosforilan y activan el factor de transcripción p53. La p53 promueve la síntesis de otra proteína, p21, que es un inhibidor de la CDK2. La inhibición de la CDK2 detiene la fosforilación de pRb que, por consiguiente, continúa unida a E2F, inhibiéndolo. Con E2F inactivado no se transcriben los genes esenciales para la división celular, con lo que ésta queda bloqueada. Cuando se ha reparado el DNA, se invierte esta serie de acontecimientos, con lo que se divide la célula.

teína MRN en un sitio de rotura de doble cadena), fosforilan p53, activándola para que sirva como factor de transcripción que estimula la síntesis de la proteína p21 (Fig. 12–48). Esta proteína inhibe la actividad proteína quinasa de la ciclina E–CDK2. En presencia de p21, pRb permanece desfosforilada y unida a E2F, bloqueando la actividad de este factor de transcripción, de modo que el ciclo celular se detiene en G1. Esto da tiempo a la célula para que repare el DNA antes de entrar en la fase S, evitando así la transferencia potencialmente desastrosa de un genoma defectuoso a una o a las dos células hijas. Cuando las lesiones son demasiado extensas para permitir una reparación efectiva, esta misma maquinaria desencadena un proceso (apoptosis, descrito más adelante) que lleva a la muerte de la célula, impidiendo así el posible desarrollo de un cáncer.

RESUMEN 12.11 Regulación del ciclo celular por proteína quinasas

- El paso a través del ciclo celular se regula por las proteína quinasas dependientes de ciclina (CDK) que actúan en puntos específicos del ciclo, fosforilando proteínas clave y modulando sus actividades. La subunidad catalítica de las CDK es inactiva a menos que esté asociada con la subunidad ciclina reguladora.
- La actividad del complejo ciclina-CDK cambia durante el ciclo celular a través de la síntesis diferencial de las CDK, la degradación específica de la ciclina, la fosforilación y desfosforilación de residuos críticos en las CDK y la unión de proteínas inhibidoras a complejos ciclina-CDK específicos.

12.12 Oncogenes, genes supresores de tumores y muerte celular programada

Los tumores y el cáncer son el resultado de una división celular incontrolada. Normalmente, la división celular está regulada por una familia de factores de crecimiento extracelulares, proteínas que provocan la división de las células latentes y, en algunos casos, su diferenciación. El resultado es un equilibrio preciso entre la formación de células nuevas (tales como las células de la piel que mueren y se reemplazan en unas pocas semanas, o los glóbulos blancos que se reemplazan al cabo de pocos días) y la destrucción celular. Cuando se rompe este equilibrio debido a defectos en las proteínas reguladoras, el resultado es a veces la formación de un clon celular que se divide de forma repetida y sin regulación (un tumor) hasta que su presencia interfiere con la función de los tejidos normales: cáncer. La causa directa es, casi siempre, un defecto genético en una o más proteínas reguladoras de la división celular. En algunos casos, se hereda un gen defectuoso de uno de los progenitores; en otros casos la mutación se produce cuando un compuesto tóxico del ambiente (mutágeno o carcinógeno) o radiaciones de alta energía interaccionan con el DNA de una célula, dañándola e introduciendo una mutación. En la mayoría de ocasiones hay tanto una contribución heredada como una contribución ambiental y, también en la mayoría de casos, se requiere más de una mutación para que tenga lugar una división totalmente fuera de control y, por consiguiente, un cáncer declarado.

Los oncogenes son formas mutadas de genes de proteínas que regulan el ciclo celular

Los **oncogenes** se descubrieron originalmente en virus causantes de tumores. Más tarde se vio que eran muy similares o que derivaban de genes presentes en las células huésped del animal, denominados **protooncogenes,** que codifican proteínas reguladoras del crecimiento. Durante las infecciones

víricas, la secuencia de DNA de un protooncogén del huésped se copia a veces por el virus y se incorpora a su genoma, donde prolifera con el virus. Durante los ciclos de infección subsiguientes, el protooncogén puede convertirse en defectuoso por ruptura o mutación. Los virus, a diferencia de las células animales, no poseen mecanismos efectivos para corregir los errores producidos durante la replicación, por lo que acumulan mutaciones rápidamente. Cuando un virus portador de un oncogén infecta una nueva célula huésped el DNA vírico (y el oncogén) pueden incorporarse en el DNA de la célula huésped, en donde puede interferir con la regulación de la división celular en la célula huésped. En un mecanismo no vírico alternativo, una célula de un tejido expuesto a carcinógenos puede sufrir una lesión en el DNA que convierte en defectuosa una de sus proteínas reguladoras con el mismo efecto que el mecanismo oncogénico: una regulación defectuosa de la división celular.

Las mutaciones que producen oncogenes son genéticamente dominantes; si alguno de los cromosomas de un par contiene un gen defectuoso, su producto génico envía la señal de "división" y se origina el tumor. El defecto oncogénico puede darse en cualquiera de las proteínas implicadas en la comunicación de la señal de "división". Entre los oncogenes descubiertos hasta el presente se encuentran los que codifican proteínas de secreción, factores de crecimiento, proteínas transmembrana (receptores), proteínas citoplasmáticas (proteínas G y proteína quinasas) y factores de transcripción nucleares que controlan la expresión de genes esenciales para la división celular (Jun, Fos).

Algunos oncogenes codifican receptores de superficie con sitios de unión de señal defectuosos o ausentes, de forma que su actividad Tyr quinasa intrínseca está desregulada. Por ejemplo, la oncoproteína ErbB es esencialmente idéntica al receptor normal del factor de crecimiento epidérmico, excepto que ErbB carece del dominio amino-terminal que normalmente une EGF **(Fig. 12–49)** y como resultado envía la señal de "división" tanto si EGF está presente como si no. Mutaciones en *erbB2*, el gen de un receptor Tyr quinasa relacionado con ErbB, están comúnmente asociadas con cánceres del epitelio glandular en la mama, el estómago y los ovarios. (Para entender el uso de la abreviaturas con las que se denominan los genes y sus productos, véase el Capítulo 25.)

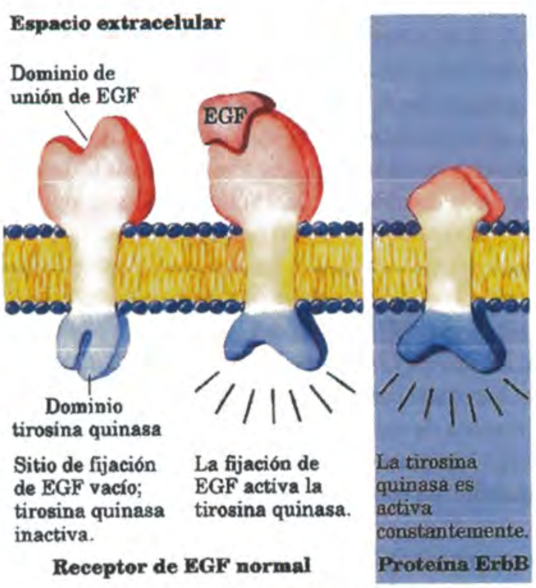


FIGURA 12–49 Receptor de EGF defectuoso codificado por un oncogén. El producto del oncogén *erbB* (la proteína ErbB) es una versión recortada del receptor normal del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Su dominio intracelular tiene la estructura normalmente inducida por la unión de EGF, pero la proteína carece del sitio de unión extracelular para EGF. Sin regulación por EGF, ErbB mantiene de forma constante la señal de división celular.

El papel prominente que juegan las proteína quinasas en los procesos de señalización relacionados con la división tanto normal como anormal las ha convertido en diana prioritaria en el desarrollo de medicamentos para el tratamiento del cáncer (Recuadro 12–5). Las formas mutantes de la proteína G Ras son comunes en células tumorales. El oncogén *ras* codifica una proteína con una unión normal a GTP pero sin actividad GTPasa. La proteína Ras mutante se encuentra siempre, por tanto, en su forma activada (GTP-unido), independientemente de si las señales llegan a través de los receptores normales. El resultado puede ser un crecimiento desregulado. Las mutaciones en *ras* están asociadas con un 30% a un 50% de los carcinomas de pulmón y colon y con más de un 90% de los carcinomas pancreáticos. ■

Defectos en ciertos genes eliminan las restricciones normales sobre la división celular

Los **genes supresores tumorales** codifican proteínas que normalmente reprimen la división celular. Mutaciones en uno o varios de estos genes pueden dar lugar a la formación de tumores. El crecimiento incontrolado provocado por genes supresores de tumores defectuosos es, a diferencia de los oncogenes, genéticamente recesivo; los tumores se forman sólo si *los dos* cromosomas de un par contienen el gen defectuoso. Esto es así porque la función de estos genes es impedir la división celular, por lo que si una u otra copia del gen para tal proteína es normal, tendrá lugar la inhibición normal de la división celular. En una persona que hereda una copia correcta y otra defectuosa, cada célula del cuerpo de esta persona contendrá una copia defectuosa del gen. Si alguna de esas 10^{12} células somáticas experimenta una mutación en la copia buena, puede crecer un tumor a partir de esa célula doble mutante. Mutaciones en ambas copias de los genes pRb, p53 o p21 dan lugar a células en las que se han perdido las restricciones sobre la división celular, con lo que se forma un tumor.

El retinoblastoma se observa en niños y produce ceguera si no se trata quirúrgicamente. Niños de muy corta edad que desarrollan retinoblastoma presentan comúnmente múltiples tumores en ambos ojos. Estos niños han heredado una copia defectuosa del gen *Rb* que está presente en todas las células; cada tumor es consecuencia de una única célula de la retina que ha sufrido una mutación en una de las copias buenas del gen *Rb*. (Un feto con los dos alelos mutados en cada célula es inviable.) Los pacientes de retinoblastoma que sobreviven a la infancia también tienen una alta incidencia de cánceres de pulmón, próstata o mama más adelante.

Un hecho mucho menos probable es que una persona que nazca con dos copias buenas del gen *Rb* sufra mutaciones independientes en ambas copias en la *misma* célula. Algunos individuos desarrollan retinoblastoma al final de la infancia, normalmente con un único tumor en un solo ojo. Estos individuos nacieron, presumiblemente, con dos copias buenas (alelos) de *Rb* en cada célula, pero han sufrido mutaciones en

RECUADRO 12-5 MEDICINA Desarrollo de inhibidores de la proteína quinasa para el tratamiento del cáncer

Cuando una célula se divide sin limitación reguladora alguna, da lugar finalmente a un clon de células tan grande que interfiere con las funciones fisiológicas normales (Fig. 1). En esto consiste el cáncer, una causa principal de muerte en el mundo desarrollado y cada vez con más incidencia en los países en vías de desarrollo. En todos los tipos de cáncer la regulación normal de la división celular no es funcional debido a defectos en uno o más genes. Por ejemplo, los genes que codifican proteínas que normalmente envían señales intermitentes para la división celular se transforman en oncogenes, produciendo proteínas de señalización constitucionalmente activas, o genes que codifican proteínas que normalmente restringen la división celular (genes supresores tumorales) y que mutan produciendo proteínas que carecen de esta función de frenado. En muchos tumores se dan ambos tipos de mutaciones.

Muchos oncogenes y genes supresores tumorales codifican proteína quinasas o proteínas que actúan en rutas con anterioridad a las proteína quinasas. Es, por tanto, razonable esperar que inhibidores específicos de proteína quinasas puedan ser valiosos en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, una forma mutante del receptor de EGF es un receptor Tyr quinasa (RTK) constantemente activo que señala división celular tanto si el EGF está presente como si no (véase la Fig. 12–49). En aproximadamente el 30% de todas las mujeres con cáncer de mama invasivo, una mutación en el gen receptor HER2/neu produce un RTK con actividad incrementada en hasta 100 veces. Otro RTK, el **receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-R),** ha de ser activado para la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para proveer a un tumor sólido su propio suministro de sangre, con lo que la inhibición de VEGF-R podría dejar al tumor sin los nutrientes esenciales. Las Tyr quinasas no receptoras también pueden mutar, con el resultado de una de una señalización constante y una división celular sin regular. Por ejemplo, el oncogén *Abl* (de *Ab*elson *l*eukemia virus) está asociado con la leucemia mieloide aguda, enfermedad sanguínea relativamente rara (~5.000 casos anuales en Estados Unidos). Otro grupo de oncogenes codifican proteína quinasas dependientes de ciclina no reguladas. En cada uno de estos casos, inhibidores de proteína quinasas específicas podrían ser valiosos agentes quimioterápicos en el tratamiento de la enfermedad. No es sorprendente que se estén realizando grandes esfuerzos en el desarrollo de tales inhibidores. ¿Cómo se podría afrontar este reto?

Las proteína quinasas de todos los tipos tienen una enorme conservación de la estructura en el sitio activo. Todas ellas comparten con la estructura prototípica de la PKA las características que se muestran en la Figura 2: dos lóbulos que contienen el sitio activo, con un bucle P que ayuda a alinear y unir los grupos fosforilo del ATP; un bucle de activación que se mueve para abrir el sitio activo al sustrato proteico, y una hélice C que cambia de posición cuando se activa el enzima y lleva los residuos de la hendidura del sitio activo a sus posiciones de unión.

Los inhibidores más sencillos de las proteína quinasas son análogos del ATP que ocupan el sitio de unión del ATP pero que no pueden actuar como dadores del grupo fosforilo. Se conocen

(continúa en la página siguiente)

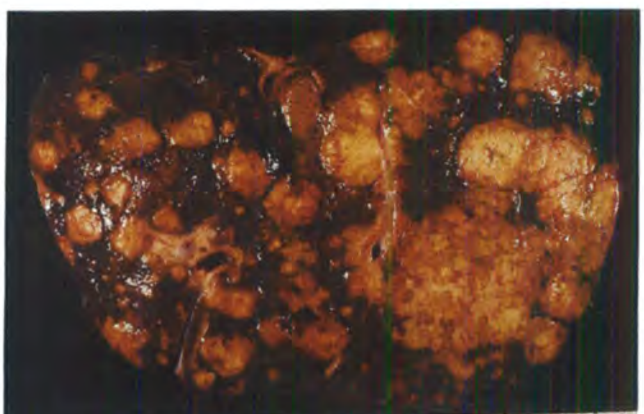


FIGURA 1 La división desregulada de una sola célula del colon condujo a un cáncer primario que hizo metástasis en el hígado. Los cánceres secundarios se ven como manchas blancas en este hígado obtenido en una autopsia.

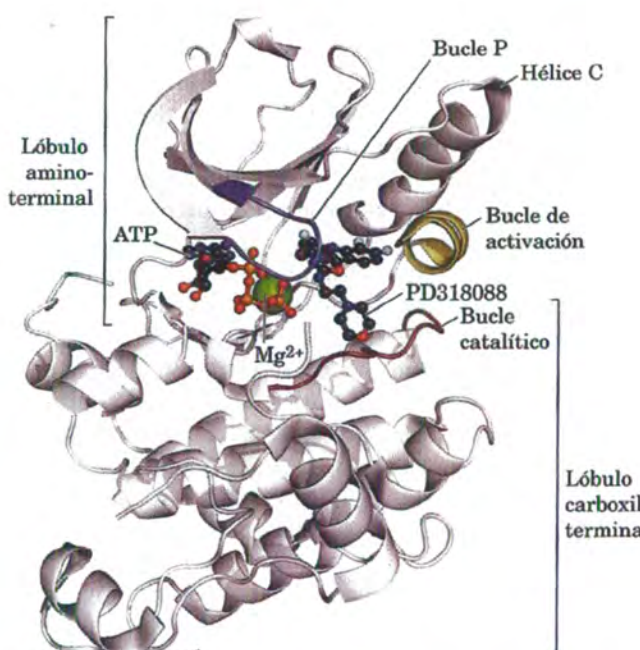


FIGURA 2 Características conservadas del sitio activo de las proteína quinasas (PDB ID 1S9I). Los lóbulos amino- y carboxilo-terminales rodean el sitio activo del enzima, cerca del bucle catalítico y del sitio de unión de ATP. El bucle de activación de ésta y muchas otras quinasas experimenta fosforilación y a continuación se desplaza lejos del sitio activo para exponer la hendidura de unión del sustrato, que en esta imagen está ocupada por un inhibidor específico de este enzima, PD318088. El bucle P es esencial para la unión del ATP y la hélice C ha de estar bien alineada para la unión del ATP y la actividad quinasa.

RECUADRO 12–5 MEDICINA **Desarrollo de inhibidores de la proteína quinasa para el tratamiento del cáncer *(continuación)***

muchos de estos compuestos, pero su utilización clínica está limitada por su falta de selectividad: inhiben prácticamente todas las proteína quinasas, con lo que se producirían efectos secundarios inaceptables. Se observa una mayor selectividad con compuestos que llenan parcialmente el sitio de unión de ATP pero que también interaccionan fuera de este sitio con partes de la proteína que son propias de la proteína quinasa diana. Una tercera estrategia posible se basa en el hecho que aunque la conformación activa de todas las proteína quinasas es similar, su conformación inactiva no lo es. Los medicamentos que se dirigen a la conformación inactiva de una proteína quinasa específica e impiden su conversión en la forma activa pueden tener una mayor especificidad de acción. Un cuarto enfoque emplea la gran especificidad de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales (p. 173) que unen las porciones extracelulares de RTK específicos podrían eliminar la actividad quinasa del receptor al impedir la dimerización o al eliminarlo de la superficie celular. En algunos casos, un anticuerpo que se uniese de manera selectiva a la superficie de las células cancerosas podría hacer que el sistema inmune atacase dichas células.

Entre 1998 y mediados de 2006, sólo se aprobaron ocho nuevos medicamentos en Estados Unidos para su uso en la terapia del cáncer: cinco moléculas pequeñas y tres anticuerpos monoclonales que habían mostrado su eficacia en ensayos clínicos. Por ejemplo, el mesilato de imatinib (Gleevec; Fig. 3a), una de las molécula pequeñas inhibidoras, es casi 100% efectivo en conseguir la remisión en pacientes con leucemia mieloide crónica en sus primeras fases. El erlotinib (Tarceva; Fig. 3b), cuya diana es el EGF-R, es efectivo contra el cáncer de pulmón no microcítico avanzado. Dado que en muchos sistemas de señalización de división celular interviene más de una proteína quinasa, los inhibidores que actúan sobre varias proteína quinasas pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer. El sunitinib (Sutent) y el sorafenib (Nexavar) tienen como diana varias proteína quinasas, entre ellas VEGF-R y PDGF-R. Estos dos fármacos se utilizan clínicamente en pacientes con tumores gastrointestinales y en carcinoma de célula renal avanzado, respectivamente. El trastuzumab (Herceptin), el cetuximab (Erbitux) y el bevacizumab (Avastin) son anticuerpos monoclonales cuyas dianas son HER2/neu, EGF-R y VEGF-R, respectivamente; los tres fármacos se utilizan clínicamente para ciertos tipos de cáncer.

Hay al menos un centenar de compuestos en ensayos preclínicos. Entre los medicamentos que se están evaluando, algunos se obtienen de fuentes naturales y otros por síntesis química. El indirubin es un componente de una preparación china a base de hierbas utilizada tradicionalmente para tratar ciertas leucemias; inhibe CDK2 y CDK5. El flavopiridol (Fig. 3d), un análogo sintético de un alcaloide obtenido de la corteza del tronco de la planta india *Amoora rohituka*, es un inhibidor general de las CDK. Con varios centenares de fármacos anticancerígenos potenciales prontos a ser ensayados clínicamente, es realista esperar que algunos serán más efectivos o más específicos de la diana que los actualmente en uso.

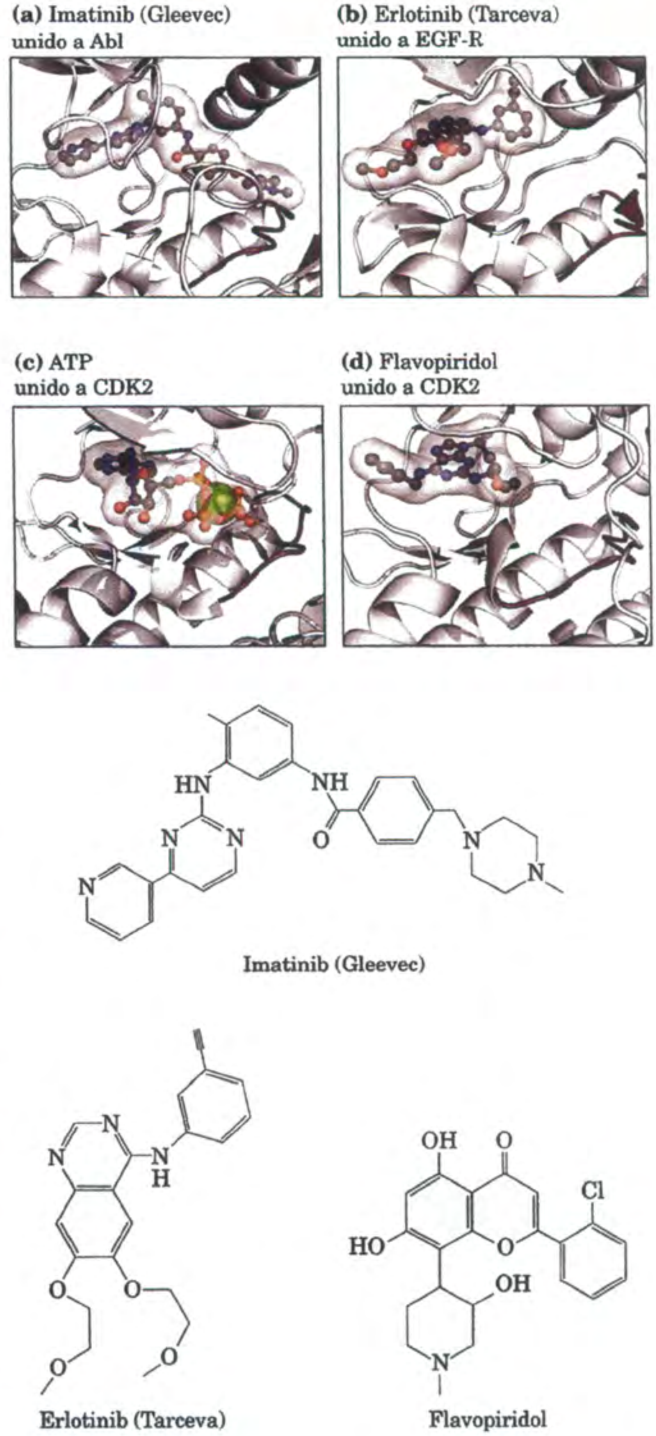


FIGURA 3 Algunos inhibidores de proteína quinasas actualmente en ensayos clínicos o en uso clínico, mostrando su unión a la proteína diana. **(a)** El imatinib se une al sitio activo de la quinasa del oncogén Abl (PDB ID 1IEP); ocupa tanto el sitio de unión del ATP como una región adyacente a dicho sitio. **(b)** El erlotinib se une al sitio activo de EGF-R (PDB ID 1M17). **(c)**, **(d)** El flavopiridol es un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina CDK2; aquí se muestran la unión normal de ATP **(c)** en el sitio activo (PDB ID 1S9I) y la unión del flavopiridol **(d)**, que impide la unión de ATP (PDB ID 2A4L).

ambos alelos *Rb* en una misma célula de la retina, produciendo un tumor. Después de los tres años de edad, las células de la retina dejan de dividirse, por lo que los retinoblastomas a edades más avanzadas son muy raros.

Los genes estabilizadores (también llamados genes vigilantes) codifican proteínas que funcionan en la reparación de defectos genéticos importantes debidos a replicación aberrante del DNA, radiación ionizante o carcinógenos ambientales. Las mutaciones en estos genes conducen a una frecuencia elevada de lesiones no reparadas (mutaciones) en otros genes, incluidos los protooncogenes y los genes supresores tumorales y, de este modo, al cáncer. Entre los genes estabilizadores se encuentran *ATM* (véase la Fig. 12–48); la familia génica *XP*, en la que las mutaciones producen xeroderma pigmentosum, y los genes *BRCA1* asociados con algunos tipos de cáncer de mama (véase el Recuadro 25–1). Mutaciones en el gen de p53 también producen tumores; en más del 90% de los carcinomas cutáneos humanos de células escamosas (cáncer de piel) y en aproximadamente un 50% de todos los demás cánceres humanos, *p53* es defectuoso. Los raros individuos que *heredan* una copia defectuosa de *p53* normalmente presentan el síndrome canceroso de Li-Fraumeni, síndrome en el que se producen múltiples cánceres (de mama, cerebro, huesos, sangre, pulmón y piel) con una alta frecuencia y a una edad temprana. La explicación para estos tumores múltiples en este caso es igual que en el caso del las mutaciones de *Rb*: es probable que un individuo nacido con una copia defectuosa de *p53* en cada célula somática sufra una segunda mutación en *p53* en más de una célula durante su vida.

Así pues, en resumen hay tres clases de defectos que pueden contribuir al desarrollo del cáncer: oncogenes, en los que el defecto es el equivalente del pedal del acelerador de un coche que queda bloqueado, con el motor en marcha a alta velocidad; los genes supresores tumorales, en los que el defecto lleva al equivalente de un fallo en los frenos, y los genes estabilizadores, en los que el defecto conduce a un daño no reparado en la maquinaria de replicación celular, equivalente a la acción de un mecánico incompetente.

El efecto de las mutaciones en oncogenes y supresores tumorales no es de todo o nada. En algunos cánceres, quizá en todos, la progresión desde una célula normal a un tumor maligno requiere una acumulación de mutaciones (algunas veces durante varias décadas), ninguna de las cuales por sí sola es responsable del efecto final. Por ejemplo, el desarrollo del cáncer colorrectal tiene varias etapas reconocibles, cada una de ellas asociada a una mutación **(Fig. 12–50)**. Si una célula epitelial normal en el colon experimenta una mutación de las dos copias del gen supresor tumoral *APC* (adenomatous polyposis coli), empieza a dividirse más rápido de lo normal y produce un clon de sí mismo, un pólipo benigno (adenoma temprano). Por razones que todavía no se conocen, las mutaciones de *APC* dan lugar a una inestabilidad cromosómica, con lo que regiones completas de un cromosoma se pierden o se reordenan durante la división celular. Esta inestabilidad puede dar lugar a otra mutación, normalmente en *ras*, que convierte el clon en un adenoma intermedio. Una tercera mutación (a menudo en el gen supresor tumoral *DCC*) conduce a un adenoma tardío. Sólo cuando las dos copias de *p53* se convierten en defectuosas esta masa celular se convierte en un carcinoma, un tumor maligno y mortal. La secuencia

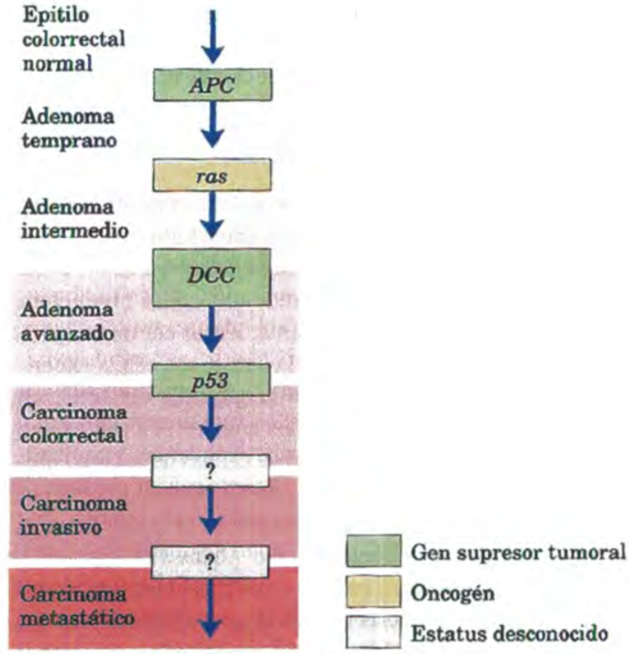


FIGURA 12–50 Desde una célula epitelial normal a un cáncer colorrectal. En el colon, mutaciones en ambas copias del gen supresor tumoral *APC* conducen a agrupamientos benignos de células epiteliales que se multiplican demasiado rápidamente (adenoma temprano). Si una célula ya defectuosa en *APC* sufre una segunda mutación en el protooncogén *ras*, la célula doble mutante desencadena un adenoma intermedio, formando un pólipo benigno. Cuando una de estas células experimenta mutaciones adicionales en los genes supresores tumorales *DCC* y *p53*, se forman tumores cada vez más agresivos. En un último paso, mutaciones en genes aún no caracterizados originan un tumor maligno y finalmente un tumor metastásico que puede extenderse a otros tejidos. La mayoría de los tumores malignos de otros tejidos probablemente son consecuencia de una serie de mutaciones como ésta.

completa requiere, por lo tanto, al menos siete "golpes" genéticos: dos en cada uno de los tres genes supresores tumorales (*APC*, *DCC* y *p53*) y uno en el protooncogén *ras*. Existen probablemente varias rutas para el cáncer colorrectal, pero es probable que continúe siendo válido el principio de que la malignidad completa sólo es el resultado de mutaciones múltiples. Cuando se detecta un pólipo en el estado de adenoma temprano y se eliminan quirúrgicamente las células que contienen las mutaciones iniciales, no se desarrollan los adenomas tardíos y los carcinomas; de ahí la importancia de una detección precoz. También las células y los organismos tienen sus sistemas de detección precoz. Por ejemplo, las proteínas ATM y ATR descritas en la Sección 12.11 pueden detectar lesiones demasiado importantes en el DNA para poderlas reparar de manera efectiva. Desencadenan entonces, a través de una ruta en la que interviene p53, el proceso de apoptosis mediante el cual una célula que se ha convertido en peligrosa para el organismo se suicida. ■

La apoptosis es el suicidio celular programado

Muchas células pueden controlar con precisión el tiempo de su propia muerte por el proceso de **muerte celular programada**, o **apoptosis** (del griego "decaer", como en las hojas que caen en el otoño). Un desencadenante de la apoptosis es el daño irreparable al DNA. La muerte celular programada también tiene lugar en el desarrollo de un embrión, cuando algunas células de-

ben morir para proporcionar a un tejido o a un órgano su forma final. El retallado de los dedos a partir de yemas en los extremos del brazo implica una temporización precisa de la muerte de las células entre los huesos de los dedos en desarrollo. Durante el desarrollo del nematodo *Caenorhabditis elegans* a partir de un huevo fertilizado, exactamente 131 células (de un total de 1.090 células somáticas en el embrión) deben sufrir una muerte programada para poder construir el cuerpo adulto.

La apoptosis cumple también algunas misiones en otros procesos aparte del desarrollo. Cuando una célula productora de anticuerpos empieza a producir anticuerpos contra una proteína o glucoproteína presente en el cuerpo, esa célula experimenta una muerte programada en la glándula del timo, un mecanismo esencial para eliminar los anticuerpos contra uno mismo. El desprendimiento mensual de células de la pared uterina (menstruación) es otro caso de muerte celular mediada por apoptosis. La caída de las hojas en otoño es el resultado de la apoptosis en células específicas del tallo. Algunas veces el suicidio celular no está programado, sino que tiene lugar como respuesta a unas circunstancias biológicas que amenazan el resto del organismo. Por ejemplo, una célula infectada por un virus que muere antes de que se complete el ciclo infeccioso impide la propagación del virus a células vecinas. Varias situaciones de estrés grave tales como calor, hiperosmolaridad, luz UV y radiación gamma también provocan el suicidio celular; seguramente el organismo se encuentra mejor con las células aberrantes muertas.

En los mecanismos de regulación que desencadenan la apoptosis intervienen algunas de las mismas proteínas que regulan el ciclo celular. La señal de suicidio a menudo proviene del exterior, a través de un receptor de la superficie. El factor de necrosis tumoral (TNF), producido por células del sistema inmunitario, interacciona con células a través de receptores específicos del TNF. Estos receptores tienen sitios de unión de TNF en la cara externa de la membrana plasmática y un "dominio de muerte" (~80 residuos aminoácidos) que pasa la señal de autodestrucción a través de la membrana a proteínas del citosol tales como TRADD (*T*NF *r*eceptor-*a*ssociated *d*eath *d*omain: dominio de muerte asociado al receptor de TNF) **(Fig. 12–51)**. Otro receptor, Fas, tiene un dominio de muerte similar que le permite interaccionar con la proteína citosólica FADD (*F*as-*a*ssociated *d*eath *d*omain: dominio de muerte asociada a Fas) que activa una proteasa citosólica llamada caspasa 8. Este enzima pertenece a una familia de proteasas que participan en la apoptosis; todas se sintetizan en forma de proenzimas inactivos, todas tienen un residuo Cys crítico en el sitio activo y todas hidrolizan sus proteínas diana en el lado carboxilo-terminal de residuos Asp específicos (de ahí el nombre de caspasa, de *Cys* y *Asp*).

Cuando la caspasa 8, una caspasa "iniciadora", se activa por una señal apoptótica transportada a través de FADD, continúa su autoactivación mediante un corte de su propia forma proenzimática. La mitocondria es una de las dianas de la caspasa 8 activa. La proteasa produce la liberación de ciertas proteínas localizadas entre las membranas mitocondriales interna y externa: citocromo *c* (Capítulo 19) y varias caspasas "efectoras". El citocromo *c* se une a la forma proenzimática del enzima efector caspasa 9 y estimula su activación proteolítica. La caspasa 9 activada a su vez cataliza una gran destrucción de proteínas celu-

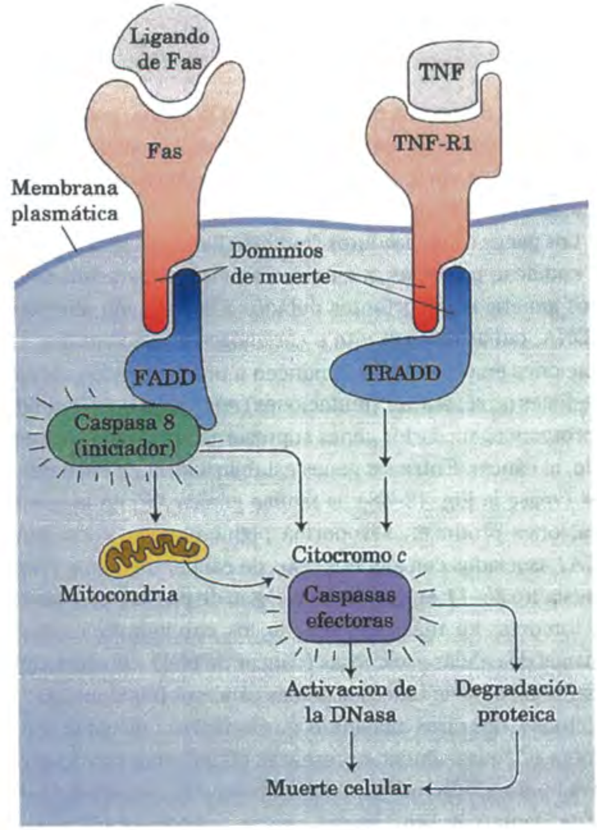


FIGURA 12–51 Acontecimientos iniciales de la apoptosis. Los receptores en la membrana plasmática (Fas, TNF-R1) reciben señales del exterior de la célula (el ligando de Fas o el factor de necrosis tumoral (TNF), respectivamente). Los receptores activados favorecen la interacción entre el "dominio de muerte" (una secuencia de 80 aminoácidos) de Fas o de TNF-R1 y un dominio de muerte similar de las proteínas citosólicas FADD o TRADD. FADD activa una proteasa citosólica llamada caspasa 8, que activa proteolíticamente otras proteasas celulares. TRADD también activa proteasas. La proteólisis resultante es un factor principal en la muerte celular.

lares, una causa principal de la muerte celular apoptótica. Una diana específica de la acción de las caspasas es una desoxirribonucleasa activada por caspasa.

En la apoptosis, los productos monoméricos de la degradación de proteínas y del DNA (aminoácidos y nucleótidos) se liberan en un proceso controlado que permite que sean captados y reutilizados por células vecinas. La apoptosis permite así que el organismo elimine una célula que ya no se necesita o que es peligrosa sin desperdiciar sus componentes.

RESUMEN 12.12 Oncogenes, genes supresores tumorales y muerte celular programada

- Los oncogenes codifican proteínas de señalización defectuosas. Al dar continuamente la señal de división celular, provocan la formación de un tumor. Los oncogenes son genéticamente dominantes y pueden codificar factores de crecimiento, receptores, proteínas G, proteína quinasas o reguladores nucleares de la transcripción defectuosos.
- Los genes supresores tumorales codifican proteínas reguladoras que normalmente inhiben la división celular; las mutaciones en estos genes son genéticamente recesivas pero pueden desencadenar la formación de tumores.

- El cáncer es generalmente el resultado de una acumulación de mutaciones en los oncogenes o en los genes supresores tumorales.
- Cuando se mutan los genes estabilizadores, que codifican proteínas necesarias para la reparación de lesiones genéticas, otras mutaciones quedan sin reparar, entre ellas mutaciones en proto oncogenes y en genes supresores tumorales, que pueden provocar el cáncer.
- La apoptosis puede ser desencadenada por señales extracelulares tales como el TNF a través de receptores de la membrana plasmática.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

Bibliografía

General

Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596–601.
Descripción histórica de los conocimientos sobre la fosforilación de proteínas.

Giepmans, B.N.G., Adams, S.R., Ellisman, M.H., & Tsien, R.Y. (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function *Science* **312**, 217–224.
Beve revisión a nivel intermedio sobre la FRET.

Pawson, T. & Scott, J.D. (2005) Protein phosphorylation in signaling—50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 286–290.

Receptores acoplados a proteína G (GPCR)

Beene, D.L. & Scott, J.D. (2007) A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 192–198.

Birnbaumer, L. (2007) The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 756–771.

Cooper, D.M.F. & Crossthwaite, A.J. (2006) Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 426–431.

DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., & Shenoy, S.K. (2007) β-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 483–510.
Revisión avanzada; una de las cinco revisiones sobre arrestinas en este número.

Escribá, P.V. (2007) G protein–coupled receptors, signaling mechanisms and pathophysiological relevance. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1768**, 747.
Introducción editorial a una serie de 20 artículos sobre GPCR.

Fredriksson, R. & Schiöth, H.B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1414–1425.

Hamm, H.E. (1998) The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 669–672.
Introducción a una serie de revisiones cortas sobre las proteínas G.

Kim, C., Xuong, N.-H., & Taylor, S.S. (2005) Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIα) subunits of PKA. *Science* **307**, 690–696.

Kobilka, B.K. (2006) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1769**, 794–807.

Lefkowitz, R.J. (2007) Introduction to special section on arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **69**.
Este artículo introduce cinco revisiones avanzadas excelentes sobre el papel de la arrestina.

Pinna, L.A. & Ruzzene, M. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191–225.

Rehmann, H., Wittinghofer, A., & Bos, J.L. (2007) Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 63–73.

Schoeneberg, T., Hofreiter, M., Schulz, A., & Roempler, H. (2007) Learning from the past: evolution of GPCR functions. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 117–121.

Yeagle, P.L. & Albert, A.D. (2006) G-protein coupled receptor structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 808–824.

Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., & Tsien, R.Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 906–918.

Base de numerosas técnicas tales como la que se describe en el Recuadro 12-3.

Receptores de enzimas

Garbers, D.L., Chrisman, T.D., Wiegn, P., Katafuchi, T., Albanesi, J.P., Bielinski, V., Barylko, B., Redfield, M.M., & Burnett, J.C., Jr. (2006) Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 251–258.

Hubbard, S.R. & Miller, W.T. (2007) Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 117–123.

Maures, T.J., Kurzer, J.H., & Carter-Su, C. (2007) SH2B1 (SH2-B) and JAK2: a multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 38–45.

Saltiel, A.R. & Pessin, J.E. (2002) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 65–71.

Revisión corta a nivel intermedio.

Shields, J.M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., & Der, C.J. (2000) Understanding Ras: it ain't over 'til it's over. *Trends Cell Biol.* **10**, 147–154.

Revisión a nivel intermedio de la proteína G monomérica Ras.

Tiganis, T. & Bennett, A.M. (2007) Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem. J.* **402**, 1–15.

Zajchowski, L.D. & Robbins, S.M. (2002) Lipid rafts and little caves: compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur. J. Biochem.* **269**, 737–752.

Proteínas adaptadoras y balsas de membranas

Bhattacharyya, R.P., Reményi, A., Yeh, B.J., & Lim, W.A. (2006) Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 655–680.

Revisión avanzada de las proteínas de señalización modulares.

Pawson, T. (2007) Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 112–116.

Smith, F.D., Langeberg, L.K., & Scott, J.D. (2006) Anchored cAMP signaling: onward and upward. A short history of compartmentalized cAMP signal transduction. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 581–698.

Revisión corta a nivel intermedio que introduce un número entero de la revista sobre el tema de la señalización por AKAP y cAMP.

Smith, F.D., Langeberg, L.K., & Scott, J.D. (2006) The where's and when's of kinase anchoring. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 316–323.

Revisión a nivel intermedio sobre las AKAP.

Receptores de canales iónicos

Véase también el Capítulo 11, Bibliografía, Canales iónicos.

Ashcroft, F.M. (2006) From molecule to malady. *Nature* **440**, 440–447.

Revisión breve a nivel intermedio de las enfermedades humanas asociadas con defectos en los canales iónicos.

Changeux, J.-P. & Edelstein, S.J. (2005) Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* **308**, 1424–1428.

Descripción breve a nivel intermedio del alosterismo de los receptores, utilizando como ejemplo el receptor de acetilcolina.

Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y. (2006) How does voltage open an ion channel? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 23–52.

Iones calcio en la señalización

Berridge, M.J., Lipp, P., & Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11–21.

Revisión a nivel intermedio.

Chin, D. & Means, A.R. (2000) Calmodulin: a prototypical calcium receptor. *Trends Cell Biol.* **10**, 322–328.

Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D., & Herman, B. (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* **79**, 1089–1125.

Revisión avanzada de los métodos para la determinación de los niveles de Ca^{2+} intracelulares en tiempo real.

Integrinas

Delon, I. & Brown, N.H. (2007) Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 43–50.

Receptores y acción de hormonas esteroideas

Biggins, J.B. & Koh, J.T. (2007) Chemical biology of steroid and nuclear hormone receptors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 99–110.

Hall, J.M., Couse, J.F., & Korach, K.S. (2001) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 36,869–36,872.

Revisión breve de nivel intermedio.

Señalización en plantas y bacterias

Assmann, S.M. (2005) G proteins go green: a plant G protein signaling FAQ sheet. *Science* **310**, 71–73.

Bakal, C.J. & Davies, J.E. (2000) No longer an exclusive club: eukaryotic signaling domains in bacteria. *Trends Cell Biol.* **10**, 32–38.

Revisión intermedia.

Becraft, P.W. (2002) Receptor kinase signaling in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 163–192.

Revisión avanzada.

Chen, Y.F., Etheridge, N., & Schaller, G.E. (2005) Ethylene signal transduction. *Ann. Botany* **95**, 901–915.

Revisión de nivel intermedio.

Ferreira, F.J. & Kieber, J.J. (2005) Cytokinin signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 518–525.

Hwang, I., Chen, H.-C., & Sheen, J. (2002) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383–389.

Li, J. & Jin, H. (2007) Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends Plant. Sci.* **12**, 37–41.

Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.-H., & Ma, L. (2007) A G protein–coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**, 1712–1216.

McCarty, D.R. & Chory, J. (2000) Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* **103**, 201–209.

Meijer, H.J.G. & Munnik, T. (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 265–306.

Revisión avanzada.

Nakagami, H., Pitzschke, A., & Hirt, H. (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Sci.* **10**, 339–346.

Paciorek, T. & Friml, J. (2006) Auxin signaling. *J. Cell Sci.* **119**, 1199–1202.

Tichtinsky, G., Vanoosthuyse, V., Cock, J.M., & Gaude, T. (2003) Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends Plant Sci.* **8**, 231–237.

Vert, G., Nemhauser, J.L., Geldner, N., Hong, F., & Chory, J. (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signalling in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 177–201.

Vista, olfato y gusto

Baylor, D. (1996) How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 560–565.

Una de las seis revisiones cortas que aparecen en este número de la revista.

Margolskee, R.F. (2002) Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J. Biol. Chem.* **277**, 1–4.

Menon, S.T., Han, M., & Sakmar, T.P. (2001) Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiol. Rev.* **81**, 1659–1688.

Revisión avanzada.

Mombaerts, P. (2001) The human repertoire of odorant genes and pseudogenes. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2**, 493–510.

Revisión avanzada.

Ciclo celular y cáncer

Bartek, J. & Lukas, J. (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 238–245.

Bublil, E.M. & Yarden, Y. (2007) The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 124–134.

Chau, B.N. & Wang, J.Y.J. (2003) Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 130–138.

Dorsam, R.T. & Gutkind, J.S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Rev. Cancer.* **7**, 79–94.

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159–170.

Pruebas sobre la existencia de procesos de etapas múltiples en el desarrollo del cáncer.

Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323–331.

Cobertura intermedia de la función de la proteína p53 en el ciclo celular normal y en el cáncer.

Obaya, A.J. & Sedivy, J.M. (2002) Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 126–142.

Sherr, C.J. & McCormick, F. (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 102–112.

Apoptosis

Anderson, P. (1997) Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 33–46.

Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–1308.

Éste y los artículos de Green y Reed y de Thornberry y Lazebnik (más adelante) se encuentran en el número de *Science* dedicado a la apoptosis.

Duke, R.C., Ojcius, D.M., & Young, J.D.-E. (1996) Cell suicide in health and disease. *Sci. Am.* **275** (December), 80–87.

Green, D.R. & Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309–1312.

Jacobson, M.D., Weil, M., & Raff, M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347–354.

Lawen, A. (2003) Apoptosis—an introduction. *Bioessays* **25**, 888–896.

Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312.

Problemas

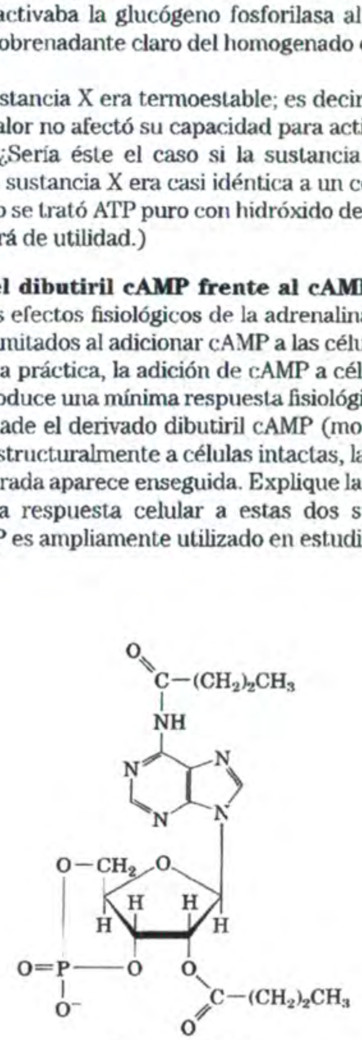
1. Experimentos hormonales en sistemas acelulares En la década de 1950, Earl W. Sutherland, Jr., y sus colegas llevaron a cabo experimentos pioneros para descubrir el mecanismo de acción de la adrenalina y el glucagón. A partir de lo que ha aprendido sobre la acción hormonal en este capítulo, interprete cada uno de los experimentos descritos a continuación. Identifique la sustancia X e indique el significado de los resultados.

(a) La adición de adrenalina a un homogenado de hígado normal provocó un incremento en la actividad de la glucógeno fosforilasa. Sin embargo, si el homogenado se centrifuga previamente a alta velocidad y con posterioridad se añade adrenalina o glucagón a la fracción clara del sobrenadante que contiene fosforilasa, no se observa en absoluto ningún incremento en la actividad fosforilasa.

(b) Cuando la fracción particulada obtenida de la centrifugación en (a) se trató con adrenalina, se produjo la sustancia X. La sustancia se aisló y purificó. A diferencia de la adrenalina, la sustancia X activaba la glucógeno fosforilasa al añadirla a la fracción del sobrenadante claro del homogenado de la centrifugación.

(c) La sustancia X era termoestable; es decir, que el tratamiento con calor no afectó su capacidad para activar la fosforilasa. (Pista: ¿Sería éste el caso si la sustancia X fuera una proteína?) La sustancia X era casi idéntica a un compuesto obtenido cuando se trató ATP puro con hidróxido de bario. (La Figura 8-6 le será de utilidad.)

2. Efecto del dibutiril cAMP frente al cAMP en células intactas Los efectos fisiológicos de la adrenalina deberían en principio ser imitados al adicionar cAMP a las células diana. Sin embargo, en la práctica, la adición de cAMP a células diana intactas sólo produce una mínima respuesta fisiológica. ¿Por qué? Cuando se añade el derivado dibutiril cAMP (mostrado abajo) relacionado estructuralmente a células intactas, la respuesta fisiológica esperada aparece enseguida. Explique la base de la diferencia en la respuesta celular a estas dos sustancias. El dibutiril cAMP es ampliamente utilizado en estudios de función del cAMP.



Dibutiril cAMP
(N^6,$O^{2'}$-Dibutiril adenosina 3',5'-monofosfato cíclico)

3. Efecto de la toxina del cólera sobre la adenilil ciclasa La bacteria gram-negativa *Vibrio cholerae* produce una proteína, la toxina del cólera (M_r 90.000), que es la responsable de los síntomas característicos del cólera: pérdida masiva del agua corporal y Na^+ a través de una continua y debilitante diarrea. Si los fluidos corporales y el Na^+ no son repuestos, aparece una deshidratación grave; si no se trata, la enfermedad es a menudo fatal. Cuando la toxina del cólera accede al tracto intestinal humano se une fuertemente a sitios específicos en la membrana plasmática de las células epiteliales

que recubren el intestino delgado, haciendo que la adenilil ciclasa experimente una activación prolongada (de horas o incluso de días).

(a) ¿Cuál es el efecto de la toxina del cólera sobre la [cAMP] en las células intestinales?

(b) Basándose en la información anterior, sugiera cómo funciona normalmente el cAMP en las células epiteliales intestinales.

(c) Sugiera un posible tratamiento para el cólera.

4. Mutaciones en la PKA Explique cómo las mutaciones en la subunidad R o C de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) pueden llevar a (a) una PKA activa constantemente o (b) a una PKA inactiva constantemente.

5. Efectos terapéuticos del albuterol Los síntomas respiratorios del asma se deben a la constricción de los bronquios y bronquiolos de los pulmones debido a la contracción del músculo liso de sus paredes. Esta constricción se puede invertir incrementando la [cAMP] en el músculo liso. Explique los efectos terapéuticos del albuterol, un agonista β-adrenérgico que se toma para el asma (por inhalación). ¿Esperaría que este medicamento tuviera algún efecto secundario? ¿Cómo se podría diseñar un fármaco que no tuviera estos efectos?

6. Terminación de señales hormonales Las señales transportadas por hormonas finalmente deben ser terminadas. Describa varios mecanismos diferentes para la terminación de dichas señales.

7. Utilización de FRET para explorar las interacciones proteína-proteína in vivo La Figura 12–8 muestra la interacción entre la β-arrestina y el receptor β-adrenérgico. ¿De qué modo usaría la FRET (véase el Recuadro 12–3) para demostrar esta interacción en células vivas? ¿Qué proteínas fusionaría? ¿Qué longitud de onda utilizaría para iluminar las células y cuál utilizaría para el seguimiento? ¿Qué esperaría observar en caso de que hubiese interacción? ¿Y si no tuviese lugar? ¿Cómo podría explicar el fracaso de este método para demostrar esta interacción?

8. Inyección de EGTA El EGTA (ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-*N,N,N′,N′*-tetraacético) es un agente quelante con un elevada afinidad y especificidad para Ca^{2+}. Al microinyectar una célula con la solución de Ca^{2+}-EGTA apropiada, se puede evitar que la $[Ca^{2+}]$ citosólica aumente por encima de 10^{-7} M. ¿Cómo podría una microinyección de EGTA afectar la respuesta celular a la vasopresina (véase la Tabla 12–4)? ¿Y al glucagón?

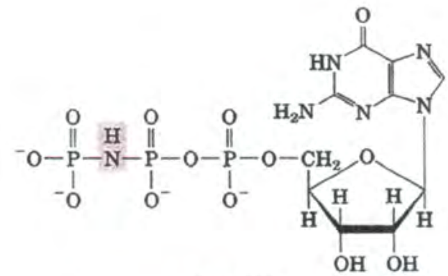
9. Amplificación de señales hormonales Describa todas las fuentes de amplificación en el sistema receptor de insulina.

10. Mutaciones en *ras* ¿De qué modo una mutación en *ras* que lleva a una proteína Ras sin actividad GTPasa afecta a la respuesta de una célula a la insulina?

11. Diferencias entre proteínas G Compare las proteínas G del tipo G_s, que actúan en la transducción de señal de receptores β-adrenérgicos, y Ras. ¿Qué propiedades comparten? ¿En qué difieren? ¿Cuál es la diferencia funcional entre G_s y G_I?

12. Mecanismos para la regulación de proteínas quinasas Identifique ocho tipos generales de proteína quinasas que se encuentran en células eucarióticas, y explique qué factor es *directamente* responsable de la activación de cada tipo.

13. Análogos de GTP no hidrolizables Muchos enzimas pueden hidrolizar GTP entre los fosfatos β y γ. El análogo del GTP β,γ-imidoguanosina 5′-trifosfato (Gpp(NH)p) no puede ser hidrolizado entre los fosfatos β y γ.



Gpp(NH)p
(β,γ-imidoguanosina 5′-trifosfato)

Prediga el efecto que provoca la microinyección de Gpp(NH)p en un miocito sobre la respuesta celular a una estimulación β-adrenérgica.

14. Utilización de la unión de una toxina para la purificación de un canal proteico La α-bungarotoxina es una potente neurotoxina que se encuentra en el veneno de una serpiente (*Bungarus multicinctus*). Se une con elevada especificidad a la proteína del receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) e impide que se abra el canal iónico. Se utilizó esta interacción para purificar AChR del órgano eléctrico del pez torpedo.

(a) Diseñe una estrategia para utilizar la α-bungarotoxina unida covalentemente a perlas cromatográficas para purificar la proteína de AChR. (Pista: Vea la Fig. 3–17c.)

(b) Diseñe una estrategia para el uso de $[^{125}I]$ α-bungarotoxina para purificar la proteína AChR.

15. Potencial de membrana en reposo Diversos invertebrados inusuales, entre los que se cuentan las almejas gigantes, los mejillones y los gusanos poliquetos, viven en los bordes de chimeneas hidrotermales en donde la temperatura es de 60 °C.

(a) El músculo aductor de una almeja gigante posee un potencial de membrana en reposo de –95 mV. Dadas las composiciones iónicas intracelula y extracelular que se muestran abajo, ¿hubiera predicho este potencial de membrana? ¿Por qué o por qué no?

	Concentración (mM)	
Ión	**Intracelular**	**Extracelular**
Na^+	50	440
K^+	400	20
Cl^-	21	560
Ca^{2+}	0,4	10

(b) Suponiendo que la membrana del músculo aductor es permeable sólo a uno de los iones arriba indicados ¿qué ión podría determinar el V_m?

16. Potenciales de membrana en huevos de rana La fertilización de un oocito de rana por un espermatozoide provoca cambios iónicos similares a los observados en las neuronas (durante el movimiento del potencial de acción) e inicia los acontecimientos que llevan a la división celular y desarrollo del embrión. Los oocitos pueden ser estimulados para dividirse sin fertilización suspendiéndolos en KCl 80 mM (el agua de una charca normal contiene KCl 9 mM).

(a) Calcule en cuánto cambia el potencial de membrana en reposo del oocito con esta variación de la [KCl] extracelular. (Pista: Suponga que el oocito contiene 120 mM de K^+ y que es permeable *sólo* al K^+.) Suponga una temperatura de 20 °C.

(b) Cuando el experimento se repite en agua sin Ca^{+2}, una [KCl] elevada no tiene ningún efecto. ¿Qué sugiere esto sobre el mecanismo del efecto del KCl?

17. Excitación desencadenada por hiperpolarización En muchas neuronas, la *despolarización* de la membrana lleva a la apertura de canales iónicos dependientes de voltaje, generación de un potencial de acción y, finalmente, un flujo de Ca^{2+} hacia el interior que provoca la liberación de neurotransmisor en el extremo del axón. Idee una estrategia celular por la que la *hiperpolarización* en los bastones pudiera producir excitación de la vía visual y el paso de señales visuales al cerebro. (Pista: La vía de señalización neuronal en organismos superiores consiste en *series* de neuronas que retransmiten información al cerebro; véase la Fig. 12–35. La señal liberada por una neurona puede ser excitadora o inhibidora para la siguiente neurona postsináptica.)

18. "Canalpatías" genéticas Existen muchas enfermedades genéticas debidas a defectos en canales iónicos. Para cada una de las siguientes, explique de qué modo el defecto molecular podría conducir a los síntomas descritos.

(a) Una mutación con pérdida de función en el gen que codifica la subunidad α del canal iónico regulado por cAMP de los conos de la retina lleva a una incapacidad total para distinguir colores.

(b) Los alelos con pérdida de función del gen que codifica la subunidad α del canal de K^+ regulado por ATP mostrados en la Figura 23-29 llevan a una enfermedad conocida como hiperinsulinismo congénito, caracterizado por altos niveles persistentes de insulina en la sangre.

(c) Mutaciones que afectan a la subunidad β del canal de K^+regulado por ATP que impiden la unión del ATP producen diabetes neonatal: niveles bajos persistentes de insulina en la sangre de los recién nacidos.

19. Desensibilización visual La enfermedad de Oguchi es una forma hereditaria de ceguera nocturna. Los individuos afectados recuperan la visión lentamente después de un destello de luz brillante sobre un fondo oscuro, tal como las luces de un coche en una autopista. Sugiera qué defecto(s) molecular(es) puede(n) ser la causa de la enfermedad de Oguchi. Explique en términos moleculares por qué este defecto produce ceguera nocturna.

20. Efecto de un análogo permeable del cGMP sobre los bastones El 8-Br-cGMP, un análogo del cGMP, es permeable a las membranas celulares, sólo se degrada lentamente por la actividad PDE de los bastones y es tan efectivo como el cGMP en la apertura del canal regulado del segmento externo de la célula. Si se suspenden bastones en un tampón que contiene una [8-Br-cGMP] relativamente elevada y a continuación se iluminan las células mientras se mide el potencial de membrana, ¿qué observará?

21. Sensaciones gustativas caliente y fría Las sensaciones de calor y frío se transducen por un grupo de canales catiónicos regulados por la temperatura. Por ejemplo, TRPV1, TRPV3 y TRPM8 están normalmente cerrados, pero se abren en las condiciones siguientes: TRPV1 a ≥43 °C; TRPV3 a ≥33 °C y TRPM8 a <25 °C. Estos canales se expresan en neuronas sensoriales que se sabe que son responsables de la sensación de temperatura.

(a) Proponga un modelo razonable para explicar de qué modo la exposición de una neurona que contenga TRPV1 a temperaturas elevadas produce una sensación de calor.

(b) La capsaicina, uno de los ingredientes activos de la pimienta "picante", es un agonista de TRPV1. La capsaicina muestra una activación del 50% en la respuesta de TRPV1 a una concentración (es decir, tiene una EC_{50}) de 32 nM. Explique por qué incluso muy pocas gotas de salsa de pimienta picante puede saber muy "caliente" sin realmente quemarle.

(c) El mentol, uno de los componentes activos de la menta, es un agonista de TRPM8 (EC_{50} = 30 μM) y de TRPV3 (EC_{50} = 20mM). ¿Qué sensación esperaría del contacto con bajas concentraciones de mentol? ¿Y con altas concentraciones?

22. Oncogenes, genes supresores tumorales y tumores Proporcione una explicación plausible sobre cómo podrían llevar a una división celular sin restricciones, cada una de las situaciones siguientes.

(a) Las células del cáncer de colon contienen a menudo mutaciones en el gen que codifica el receptor de la prostaglandina E_2. La PGE_2 es un factor necesario para la división de las células del tracto gastrointestinal.

(b) El sarcoma de Kaposi, un tumor frecuente en las personas con sida sin tratar, está producido por un virus portador de un gen de una proteína similar a los receptores de quimioquinas CXCR1 y CXCR2. Las quimioquinas son factores de crecimiento con especificidad de célula.

(c) El adenovirus, un virus tumoral, es portador de un gen de la proteína E1A que se une a la proteína del retinoblastoma, pRb. (Pista: Vea la Fig. 12–48.)

(d) Una característica importante de muchos oncogenes y de genes supresores tumorales es su especificidad por el tipo celular. Por ejemplo, no se encuentran mutaciones en el receptor de PGE_2 en los tumores pulmonares. Explique esta observación. (Tenga en cuenta que la PGE_2 actúa a través de un GPCR en la membrana plasmática.)

23. Mutaciones en genes supresores tumorales y oncogenes Explique por qué las mutaciones en genes supresores tumorales son recesivas (las dos copias del gen tienen que ser defectuosas para que la regulación de la división celular sea defectuosa), mientras que las mutaciones en oncogenes son dominantes.

24. Retinoblastoma en niños Explique por qué algunos niños con retinoblastoma desarrollan múltiples tumores de retina en ambos ojos, mientras que otros tienen un único tumor en un solo ojo.

25. Especificidad de una señal para un único tipo celular Discuta la validez de la siguiente proposición. Una molécula de señalización (hormona, factor de crecimiento o neurotransmisor) obtienen respuestas idénticas en diferentes tipo de células diana si contienen receptores idénticos.

Problema de análisis de datos

26. Exploración de la sensación de gusto en ratones En la Figura 12-41 se muestra la ruta de transducción de señal del sabor dulce en los mamíferos. Los sabores agradables constituyen una adaptación evolutiva para animar a los animales a consumir alimentos nutritivos. Zhao y colaboradores (2003) examinaron las dos principales sensaciones agradables del gusto: dulce y umami. El umami es un "gusto sabroso no salado distinto" provocado por aminoácidos, especialmente aspartato y glutamato, que probablemente anima a los animales a consumir alimentos ricos en proteína. El glutamato monosódico (MSG) es un potenciador del sabor que explota esta sensibilidad.

En el momento en que se publicó el artículo, se habían caracterizado de manera tentativa las proteínas receptoras específicas del gusto (marcadas SR en la Fig. 12–41) dulce y umami. Se conocían tres de estas proteínas (T1R1, T1R2 y T1R3) que funcionan en forma de complejos receptores heterodiméricos: T1R1-T1R3 se identificó de manera tentativa como el receptor del umami y T1R2-T1R3 como el receptor del dulce. No estaba claro de qué manera se codificaba la sensación del gusto y se enviaba al cerebro, y se propusieron dos modelos posibles. En el modelo basado en la célula, células sensoras del gusto individuales expresan sólo una clase de receptor; es decir, hay "células dulces", "células amargas", "células umami", etc., de modo

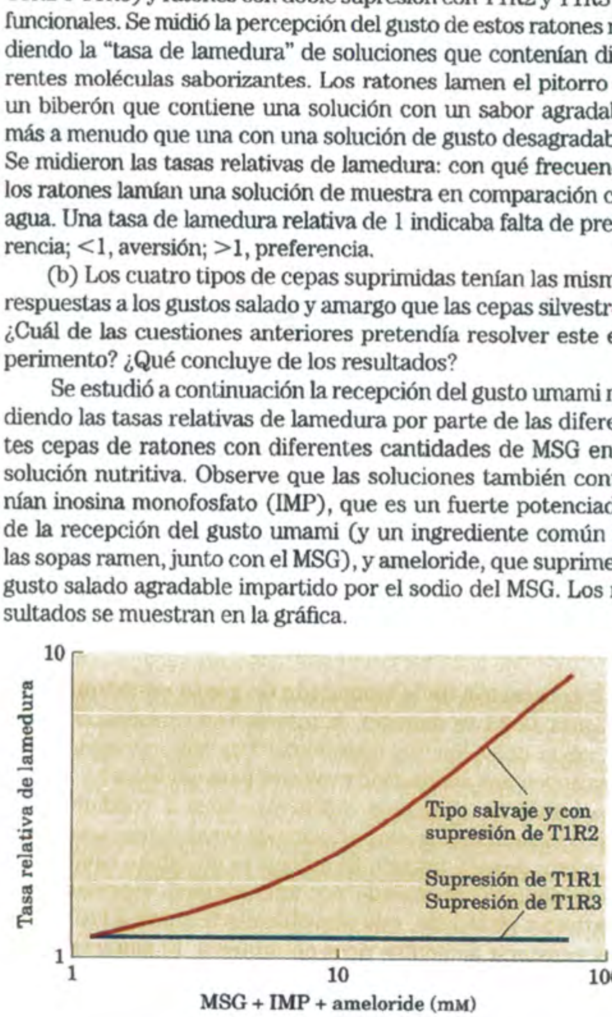
que cada tipo de células envía su información al cerebro a través de nervios diferentes. El cerebro "conoce" qué gusto se ha detectado por la identidad de la fibra nerviosa que transmite el mensaje. En el modelo basado en el receptor, las células sensoras del gusto individuales tienen diversas clases de receptores que envían mensajes diferentes a lo largo de la misma fibra nerviosa al cerebro, dependiendo el mensaje según sea el receptor activado. En aquel momento tampoco estaba claro si había alguna interacción entre las diferentes sensaciones del gusto o si se necesitaban partes de un sistema sensor de sabor para otras sensaciones de sabor.

(a) Trabajos previos habían demostrado que diferentes proteínas de los receptores del gusto se expresan en conjuntos no solapantes de células receptoras del gusto. ¿Qué modelo apoya este hecho? Explique su razonamiento.

Zaho y colaboradores construyeron un conjunto de "ratones suprimidos" (knockout) (ratones homocigotos para alelos con pérdida de función de una de las tres proteínas receptoras, T1R1, T1R2 o T1R3) y ratones con doble supresión con T1R2 y T1R3 no funcionales. Se midió la percepción del gusto de estos ratones midiendo la "tasa de lamedura" de soluciones que contenían diferentes moléculas saborizantes. Los ratones lamen el pitorro de un biberón que contiene una solución con un sabor agradable más a menudo que una con una solución de gusto desagradable. Se midieron las tasas relativas de lamedura: con qué frecuencia los ratones lamían una solución de muestra en comparación con agua. Una tasa de lamedura relativa de 1 indicaba falta de preferencia; <1, aversión; >1, preferencia.

(b) Los cuatro tipos de cepas suprimidas tenían las mismas respuestas a los gustos salado y amargo que las cepas silvestres. ¿Cuál de las cuestiones anteriores pretendía resolver este experimento? ¿Qué concluye de los resultados?

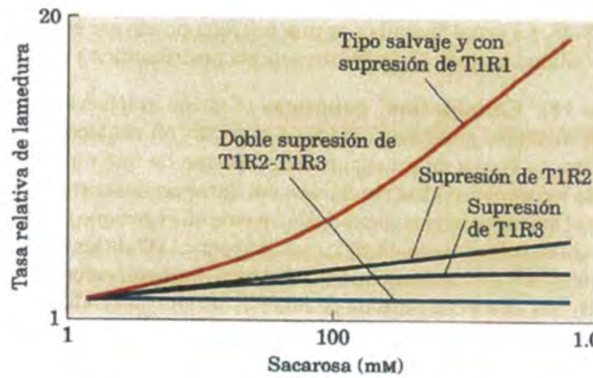
Se estudió a continuación la recepción del gusto umami midiendo las tasas relativas de lamedura por parte de las diferentes cepas de ratones con diferentes cantidades de MSG en la solución nutritiva. Observe que las soluciones también contenían inosina monofosfato (IMP), que es un fuerte potenciador de la recepción del gusto umami (y un ingrediente común de las sopas ramen, junto con el MSG), y ameloride, que suprime el gusto salado agradable impartido por el sodio del MSG. Los resultados se muestran en la gráfica.



(c) ¿Son consistentes estos datos con que el receptor del gusto umami consista en un heterodímero de T1R1 y T1R3? ¿Por qué sí o por qué no?

(d)¿Qué modelo o modelos de codificación de gusto apoya este resultado? Explique su razonamiento.

Zaho y colaboradores llevaron a cabo seguidamente una serie de experimentos similares utilizando sacarosa como sabor dulce. Estos resultados se muestran a continuación.



(e) ¿Son estos datos consistentes con que el receptor del gusto dulce consista en un heterodímero de T1R2 y T1R3? ¿Por qué sí o por qué no?

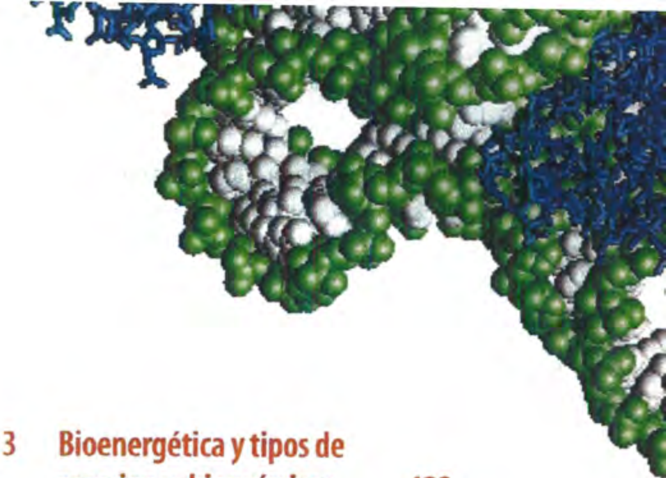
(f) Hubo algunas respuestas inesperadas a concentraciones muy elevadas de sacarosa. ¿De qué modo complican la idea de un sistema herodimérico tal como se ha presentado con anterioridad?

Además de azúcares, los humanos también apreciamos como dulces otros compuestos (por ejemplo, los péptidos monelina y aspartamo); los ratones no les encuentran sabor dulce. Zaho y colaboradores insertaron en los ratones suprimidos en T1R2 una copia del gen humano T1R2 bajo control del gen promotor de T1R2 del ratón. Estos ratones ahora reconocían el sabor dulce de la monelina y de la sacarina. A continuación, los investigadores fueron más allá, añadiendo a los ratones suprimidos en T1R1 la proteína RASSL, un receptor unido a una proteína G del opiáceo sintético espiradolina; el gen de RASSL estaba bajo control de un promotor que podía ser inducido alimentando los ratones con tetraciclina. Estos ratones no preferían la espiradolina en ausencia de tetraciclina; en presencia de tetraciclina mostraron una fuerte preferencia por la espiradolina a concentraciones nanomolares.

(g) ¿De qué modo estos experimentos refuerzan las conclusiones de Zaho y colaboradores acerca del mecanismo de la sensación del gusto?

Referencia

Zaho, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J.P., & Zuker, C. (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **115**, 255–266.



PARTE II

BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO

El metabolismo es una actividad celular muy coordinada en la que muchos sistemas multienzimáticos (rutas metabólicas) cooperan para (1) obtener energía química a partir de energía solar o degradando nutrientes ricos en energía obtenidos del ambiente; (2) convertir moléculas nutrientes en las moléculas características de la propia célula, incluidos los precursores de macromoléculas; (3) polimerizar los precursores monoméricos en macromoléculas: proteínas, ácidos nucleicos, y polisacáridos, y (4) sintetizar y degradar biomoléculas para funciones celulares especializadas, tales como los lípidos de membrana, mensajeros intracelulares y pigmentos.

Aunque el metabolismo abarca cientos de reacciones diferentes catalizadas por enzimas, las rutas metabólicas centrales, nuestro foco de atención principal en la Parte II, son pocas y son, además, notablemente similares en todas las formas de vida. Los organismos vivos se pueden dividir en dos grandes grupos según la forma química a través de la que obtienen carbono del medio. Los **autótrofos** (tales como las bacterias fotosintéticas, las algas verdes y las plantas superiores) utilizan dióxido de carbono de la atmósfera como única fuente de carbono a partir de la cual construyen todas sus biomoléculas carbonadas (véase la Fig. 1–5). Algunos organismos autotróficos, tales como las cianobacterias, pueden utilizar también el nitrógeno atmosférico para generar todos sus compuestos nitrogenados. Los **heterótrofos** no pueden utilizar el dióxido de carbono atmosférico, por lo que han de obtener carbono del ambiente en forma de moléculas orgánicas relativamente complejas tales como la glucosa. Los animales multicelulares y la mayo-

ría de microorganismos son heterotróficos. Las células y organismos autotróficos son relativamente autosuficientes, mientras que las células y organismos heterotróficos han de subsistir a partir de los productos de otros organismos.

Muchos organismos autotróficos son fotosintéticos y obtienen su energía a partir de la luz solar, mientras que los organismos heterotróficos obtienen su energía de la degradación de nutrientes orgánicos producidos por los autótrofos. En nuestra biosfera, los autótrofos y los heterótrofos viven en un gran ciclo interdependiente en el que los organismos autotróficos utilizan el dióxido de carbono atmosférico para construir sus biomoléculas orgánicas, generando algunos de ellos oxígeno a partir de agua. Los heterótrofos, a su vez, utilizan los productos orgánicos de los autótrofos como nutrientes y devuelven dióxido de carbono a la atmósfera. Algunas de las reacciones de oxidación que producen dióxido de carbono también consumen oxígeno, convirtiéndolo en agua. Así, carbono, oxígeno y agua se ciclan constantemente entre los mundos heterotrófico y autotrófico, con la energía solar como fuerza motriz **(Fig. 1)**.

Todos los organismos vivos necesitan también una fuente de nitrógeno, necesaria para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos. Las plantas pueden, generalmente, utilizar amoníaco o nitratos como única fuente de nitrógeno, pero los animales vertebrados deben obtener nitrógeno en forma de aminoácidos u otros compuestos orgánicos. Sólo unos cuantos organismos, las cianobacterias y muchas especies de bacterias del suelo que viven simbióticamente en las raíces de algunas plantas, son capaces de convertir ("fijar") nitrógeno atmosférico (N_2) en amoníaco. Otras bacterias (las bacterias nitrificantes) oxidan el amoníaco a nitritos y nitratos, y otras convierten el nitrato en N_2. Las bacterias anamox convierten amoníaco y nitrito en N_2. Así, además de los ciclos globales del carbono y del oxígeno, en la biosfera opera un ciclo del nitrógeno

FIGURA 1 Ciclo del dióxido de carbono y del oxígeno entre los dominios autotrófico (fotosintético) y heterotrófico en la biosfera. El flujo de masa a través del ciclo es enorme; se transforman anualmente alrededor de 4×10^{11} toneladas métricas de carbono en la biosfera.

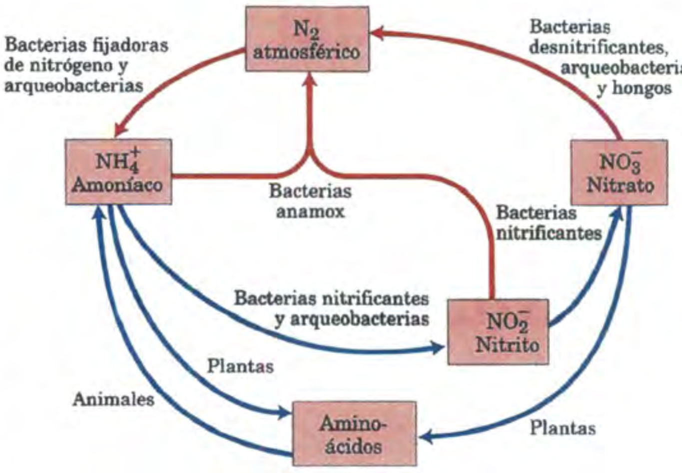


FIGURA 2 Ciclo del nitrógeno en la biosfera. El nitrógeno gas (N_2) constituye el 80% de la atmósfera de la Tierra.

en el que se transforman enormes cantidades de nitrógeno **(Fig. 2)**. El ciclado del carbono, oxígeno y nitrógeno, en el que intervienen todas las especies, depende de un equilibrio adecuado entre las actividades de los productores (autótrofos) y los consumidores (heterótrofos).

Estos ciclos de materia son impulsados por un enorme flujo de energía hacia y a través de la biosfera, que empieza con la captura de la energía solar por los organismos fotosintéticos y la utilización de esta energía para generar glúcidos y otros nutrientes orgánicos ricos en energía; estos nutrientes se utilizan a su vez como fuentes de energía por los organismos heterotróficos. En los procesos metabólicos, y en todas las transformaciones de energía, se produce una pérdida de energía útil (energía libre) y un aumento inevitable de la cantidad de energía no utilizable (calor y entropía). Por tanto, la energía fluye en una sola dirección a través de la biosfera; los organismos vivos no pueden regenerar energía útil a partir de energía disipada en forma de calor y entropía. Carbono, oxígeno y nitrógeno se reciclan continuamente, pero la energía se transforma en formas no utilizables como el calor.

El **metabolismo**, que es la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo, tiene lugar en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente que constituyen las **rutas metabólicas.** Cada paso de una ruta metabólica ocasiona un pequeño cambio químico específico, normalmente la eliminación, transferencia o adición de un átomo o grupo funcional. El precursor se convierte en producto a través de una serie de intermediarios metabólicos denominados **metabolitos.** El término **metabolismo intermediario** se aplica a las actividades combinadas de todas las rutas metabólicas que interconvierten precursores, metabolitos y productos de baja masa molecular (generalmente $M_r < 1.000$).

El **catabolismo** es la fase degradativa del metabolismo en el que moléculas nutrientes orgánicas (glúcidos, grasas y proteínas) se convierten en productos más pequeños y sencillos (ácido láctico, CO_2, NH_3). Las rutas catabólicas liberan energía, parte de la cual se conserva en la formación de ATP y transportadores electrónicos reducidos (NADH, NADPH y $FADH_2$); el resto se pierde en forma de calor. En el **anabolismo,** o biosíntesis, precursores pequeños y sencillos se integran en moléculas mucho mayores y complejas como lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Las reacciones anabólicas requieren un aporte de energía, generalmente en forma del potencial de transferencia del grupo fosforilo del ATP y el poder reductor del NADH, NADPH y $FADH_2$ **(Fig. 3)**.

Algunas rutas metabólicas son lineales y otras son ramificadas, dando varios productos finales a partir de un solo precursor o convirtiendo varios materiales de partida en un solo producto. En general, las rutas catabólicas son *convergentes* y las anabólicas son *divergentes* **(Fig. 4)**. Algunas rutas son cíclicas: uno de los componentes iniciales de la ruta se regenera en una serie de reacciones

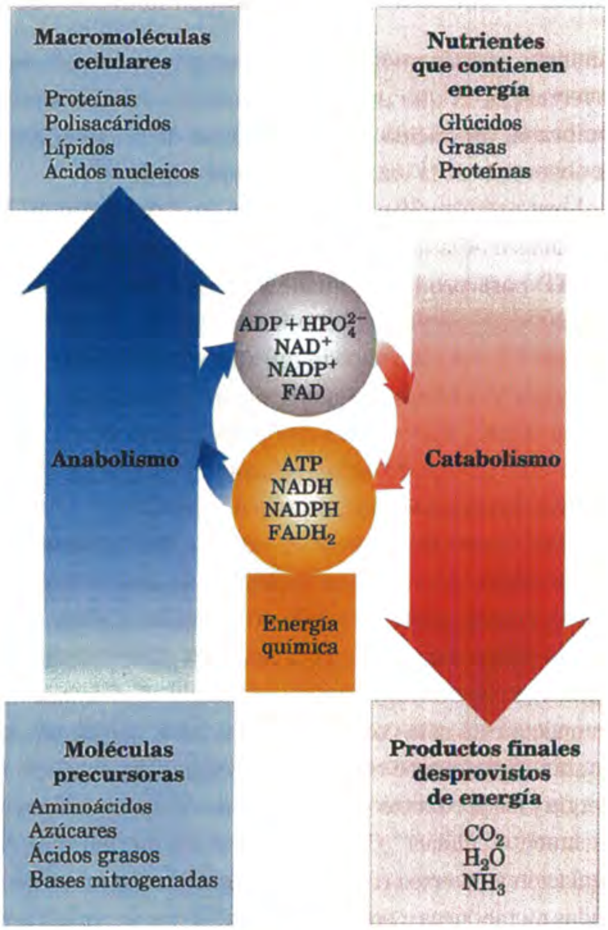


FIGURA 3 Relaciones energéticas entre rutas catabólicas y anabólicas. Las rutas catabólicas suministran energía química en forma de ATP, NADH, NADPH, y $FADH_2$. Estos transportadores de energía se utilizan en las rutas anabólicas para convertir moléculas precursoras pequeñas en macromoléculas celulares.

que convierten otro material de partida en un producto. En los siguientes capítulos veremos cada tipo de ruta.

La mayoría de células contienen los enzimas para llevar a cabo tanto la degradación como la síntesis de las categorías importantes de biomoléculas —ácidos grasos, por ejemplo—. La síntesis y degradación simultáneas de ácidos grasos sería sin embargo un despilfarro, que se evita regulando recíprocamente las secuencias de reacciones anabólicas y catabólicas: cuando una tiene lugar la otra está suprimida. Tal regulación no podría tener lugar si las rutas anabólica y catabólica estuviesen catalizadas por el mismo conjunto de enzimas, operando en una dirección para el anabolismo y en la opuesta para el catabolismo: la inhibición de un enzima implicado en el catabolismo también inhibiría la secuencia de reacciones en la dirección opuesta, la anabólica. Las rutas catabólica y anabólica que conectan los mismos puntos finales (glucosa $\rightarrow \rightarrow$ piruvato y piruvato $\rightarrow \rightarrow$ glucosa, por ejemplo) pueden emplear muchos enzimas de forma común pero al menos uno de los pasos está catalizado por enzimas diferentes en las direcciones anabólica y catabólica, siendo estos enzimas los sitios de regulación específicos. Además, para que tanto la ruta anabólica como la catabólica sean irreversibles, las reacciones que son específicas de cada dirección deben incluir por lo menos una que sea termodinámicamente muy favorable; dicho de otra forma, una reacción para la cual la reacción inversa sea muy desfavorable. Como una contribución más a la regulación independiente de las secuencias de reacción catabólica y anabólica, los pares de rutas anabólicas y catabólicas se dan frecuentemente en compartimientos celulares diferentes: por ejemplo, el catabolismo de los ácidos grasos en la mitocondria y la síntesis de ácidos grasos en el citosol. Las concentraciones de intermedios, enzimas y reguladores se pueden mantener a niveles diferentes en estos compartimientos separados. Puesto que las rutas metabólicas están sujetas a control cinético por la concentración de sustrato, los depósitos separados de intermedios anabólicos y catabólicos contribuyen también al control de las velocidades metabólicas. Los dispositivos para la separación de procesos anabólicos y catabólicos serán de interés especial en la discusión del metabolismo.

Las rutas metabólicas están reguladas a varios niveles. La regulación más inmediata es a través de la disponibilidad de sustrato; cuando la concentración intracelular del sustrato de un enzima está próxima o por debajo de la K_m (tal como sucede frecuentemente), la velocidad de la reacción depende fuertemente de la concentración de sustrato (véase la Fig. 6–11). Un segundo tipo de control rápido desde el interior es la regulación alostérica (p. 220) por un

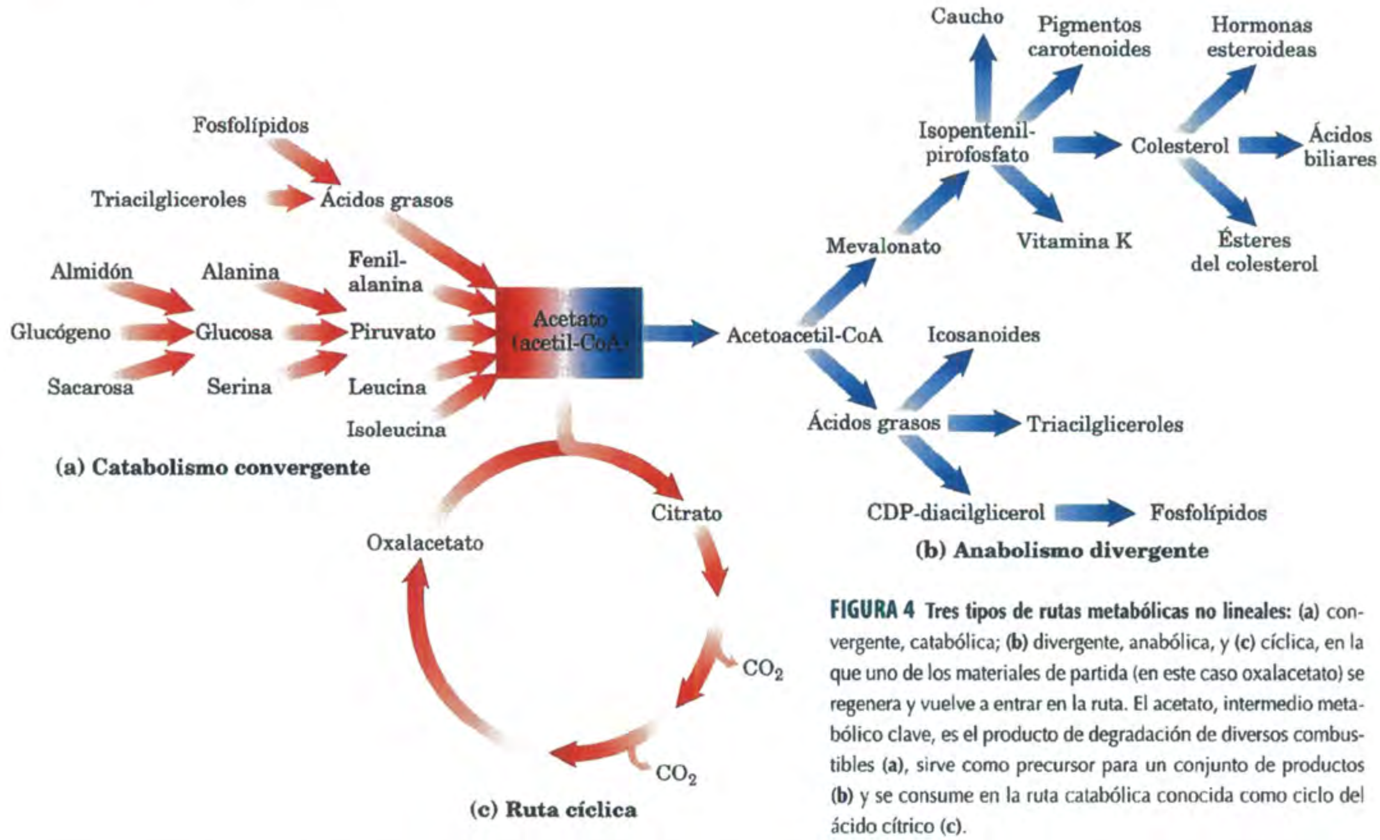


FIGURA 4 **Tres tipos de rutas metabólicas no lineales: (a)** convergente, catabólica; **(b)** divergente, anabólica, y **(c)** cíclica, en la que uno de los materiales de partida (en este caso oxalacetato) se regenera y vuelve a entrar en la ruta. El acetato, intermedio metabólico clave, es el producto de degradación de diversos combustibles **(a)**, sirve como precursor para un conjunto de productos **(b)** y se consume en la ruta catabólica conocida como ciclo del ácido cítrico **(c)**.

intermedio metabólico o coenzima (un aminoácido o ATP, por ejemplo) que señala el estado metabólico interno de la célula. Cuando la célula tiene una cantidad suficiente de aspartato, por ejemplo, para sus necesidades inmediatas, o cuando el nivel celular de ATP indica que no es necesario de momento un consumo adicional de combustible, estas señales inhiben de forma alostérica la actividad de uno o más enzimas de la ruta pertinente. En los organismos multicelulares las actividades metabólicas de los diferentes tejidos son reguladas e integradas por factores de crecimiento y hormonas que actúan desde el exterior de la célula. En algunos casos, esta regulación tiene lugar de forma prácticamente instantánea (algunas veces en menos de un milisegundo) a través de cambios en los niveles de mensajeros intracelulares que modifican la actividad de las moléculas de enzima existentes mediante mecanismos alostéricos o a través de una modificación covalente tal como la fosforilación. En otros casos, la señal extracelular modifica la concentración celular de un enzima a través de la alteración de la velocidad de su síntesis o degradación, de forma que el efecto sólo se nota después de unos minutos u horas.

Empezamos la Parte II con una discusión de los principios energéticos básicos que gobiernan todo el metabolismo (Capítulo 13). A continuación consideramos las principales rutas catabólicas mediante las que las células obtienen energía a partir de la oxidación de diversos combustibles (Capítulos 14 a 19). El Capítulo 19 trata del acoplamiento quimiosmótico de la energía, el mecanismo universal por el que un potencial electroquímico transmembrana, producido por la oxidación de un sustrato o por absorción de la luz, impulsa la síntesis de ATP.

Los Capítulos 20 a 22 describen las principales rutas anabólicas mediante las que las células utilizan la energía del ATP para producir glúcidos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos a partir de precursores más sencillos. En el Capítulo 23 nos alejamos de nuestra visión detallada de las rutas metabólicas (tal como se dan en todos los organismos desde *Escherichia coli* a los humanos) y consideramos de qué modo están reguladas e integradas en los mamíferos mediante mecanismos hormonales.

Pero antes de empezar el estudio del metabolismo intermediario, no olvide que la pléyade de reacciones descritas en estas páginas se dan en organismos vivos. Pregúntese sobre cada reacción y cada ruta ¿Qué consigue el organismo con esta transformación química? ¿Cómo se interconecta esta ruta con las restantes rutas que tienen lugar simultáneamente en la misma célula para producir la energía y los productos requeridos para el mantenimiento y crecimiento celular? ¿Cómo cooperan los mecanismos de regulación a diversos niveles para equilibrar las entradas y salidas metabólicas y energéticas con las que se consigue el estado estacionario dinámico de la vida? Estudiado con esta perspectiva, el metabolismo proporciona conocimientos fascinantes y reveladores sobre la vida, con incontables aplicaciones en medicina, agricultura y biotecnología.

> La energía total del universo es constante; la entropía total aumenta continuamente.
>
> —*Rudolf Clausius,* The Mechanical Theory of Heat with Its Applications to the Steam-Engine and to the Physical Properties of Bodies, *1865*
>
> El isomorfismo de la entropía y la información establece una unión entre las dos formas de poder: el poder de hacer y el poder para dirigir lo que se hace.
>
> —*François Jacob,* La logique du vivant: une histoire de l'hérédité, *1970*

13

Bioenergética y tipos de reacciones bioquímicas

Las células y los organismos vivos han de desarrollar trabajo para permanecer vivos, crecer y reproducirse. La capacidad de aprovechar la energía y canalizarla en trabajo biológico es una propiedad fundamental de todos los organismos vivos; debió ser adquirida muy pronto en la evolución celular. Los organismos modernos realizan una notable variedad de transducciones de energía, conversiones de una forma de energía a otra. Utilizan la energía química de los combustibles para conseguir la síntesis de macromoléculas complejas, altamente ordenadas, a partir de precursores sencillos. También convierten la energía química de los combustibles en gradientes de concentración y gradientes eléctricos, en movimiento, calor e incluso, en algunos organismos como las luciérnagas y algunos peces abisales, en luz. Los organismos fotosintéticos transducen la energía luminosa en todas estas otras formas de energía.

Antoine Lavoisier, 1743–1794

Los mecanismos químicos en los que se basan las transducciones biológicas de energía han fascinado y desafiado a los biólogos durante siglos. El químico francés Antoine Lavoisier antes de ser guillotinado durante la Revolución Francesa reconoció que los animales transforman de algún modo los combustibles químicos (alimentos) en calor y que este proceso de la respiración es esencial para la vida. Observó que

> . . . en general, la respiración no es más que una combustión lenta de carbono e hidrógeno, que es totalmente similar a lo que ocurre en una lámpara o candela encendidas y, desde este punto de vista, los animales que respiran son verdaderos cuerpos combustibles que se queman y consumen a sí mismos... Uno podría decir que esta analogía entre combustión y respiración no ha escapado a la observación de los poetas, o más bien de los filósofos de la antigüedad, quienes la han comentado e interpretado. Este fuego robado del cielo, esta antorcha de Prometeo, no representa solamente una idea ingeniosa y poética, es una representación fiel de las operaciones de la naturaleza, al menos en lo que respecta a los animales que respiran; uno puede decir, por tanto, con los antiguos, que la antorcha de la vida se enciende a sí misma en el momento en que un recién nacido respira por primera vez y no se extingue sino con la muerte.*

En el siglo XX se empezó a conocer una gran parte de la química en que se basa esta "antorcha de la vida". Las transducciones biológicas de energía obedecen las mismas leyes físicas que gobiernan el resto de procesos naturales. Es, por tanto, esencial para el estudiante de bioquímica entender estas leyes y la forma en que son aplicables al flujo de energía en la biosfera.

En este capítulo revisaremos primeramente las leyes de la termodinámica y las relaciones cuantitativas entre energía libre, entalpía y entropía. Describiremos seguidamente los tipos de reacciones químicas comunes que tienen lugar en las células vi-

*De una memoria de Armand Seguin y Antoine Lavoisier, fechada en 1789, citada en Lavoisier, A. (1862) *Oeuvres de Lavoisier*, Imprimerie Impériale, Paris.

vas, reacciones que aprovechan, almacenan, transfieren y liberan la energía captada por los organismos a partir de su entorno. Nuestro interés se desplazará seguidamente al papel especial del ATP en los intercambios de energía biológica. Finalmente, consideraremos la importancia de las reacciones de oxidación-reducción en las células vivas, la energética de las reacciones de transferencia de electrones y los transportadores de electrones utilizadas normalmente como cofactores en estos procesos.

13.1 Bioenergética y termodinámica

La bioenergética es el estudio cuantitativo de las **transducciones de energía,** cambios de una forma de energía en otra, que tienen lugar en las células vivas y de la naturaleza y función de los procesos químicos sobre los que se basan estas transducciones. Aunque muchos de los principios de la termodinámica ya se han introducido en capítulos anteriores y pueden serle familiares, vale la pena revisar aquí los aspectos cuantitativos de estos principios.

Las transformaciónes biológicas de energía obedecen las leyes de la termodinámica

Muchas observaciones cuantitativas realizadas por físicos y químicos sobre la interconversión de las diferentes formas de energía condujeron a la formulación, en el siglo XIX, de dos leyes fundamentales de la termodinámica. La primera ley es el principio de conservación de la energía: *en cualquier cambio físico o químico, la cantidad total de energía en el universo permanece constante; la energía puede cambiar de forma o puede ser transportada de una región a otra, pero no puede ser creada o destruida.* La segunda ley de la termodinámica, que se puede enunciar de diversas maneras, dice que el universo tiende siempre hacia un aumento del desorden: *en todos los procesos naturales, aumenta la entropía del universo.*

"Bien, en la *segunda* ley de la termodinámica..."

Los organismos vivos consisten en colecciones de moléculas mucho más organizadas que los materiales circundantes a partir de las cuales están construidas, y mantienen y producen orden, aparentemente inconscientes de la segunda ley de la termodinámica. Pero los organismos vivos no violan la segunda ley sino que operan estrictamente dentro de ella. Para discutir la aplicación de la segunda ley a los sistemas biológicos, debemos definir primero estos sistemas y su entorno.

El sistema de reacción es el conjunto de materia que está experimentando un proceso químico o físico determinado; puede ser tanto un organismo como una célula o dos compuestos químicos que reaccionan.

El sistema de reacción y su entorno conjuntamente constituyen el universo. En el laboratorio, algunos procesos químicos o físicos pueden llevarse a cabo en sistemas aislados o cerrados, en los que no se intercambia materia ni energía con el entorno. Sin embargo, tanto las células como los organismos vivos son sistemas abiertos que intercambian tanto materiales como energía con su entorno; los sistemas vivos realmente no se encuentran nunca en equilibrio con su entorno, y las constantes transacciones entre el sistema y el entorno explican cómo los organismos pueden crear orden en su interior al tiempo que operan dentro de la segunda ley de la termodinámica.

En el Capítulo 1 (p. 22) hemos definido tres cantidades termodinámicas que describen los cambios de energía que tienen lugar en una reacción química:

> La **energía libre de Gibbs,** G**,** expresa la cantidad de energía capaz de realizar trabajo durante una reacción a temperatura y presión constantes. Cuando una reacción transcurre con liberación de energía libre (es decir, cuando el sistema cambia de manera que tiene al final menos energía libre), la variación de energía libre, ΔG, tiene signo negativo y se dice que la reacción es exergónica. En las reacciones endergónicas, el sistema gana energía libre, por lo que ΔG es positiva.
>
> La **entalpía,** H**,** es el contenido calórico del sistema de reacción. Refleja el número y la clase de enlaces químicos en los reactivos y los productos. Cuando una reacción química libera calor, se dice que es una reacción exotérmica; el contenido calórico de los productos es menor que el de los reactivos y ΔH tiene, por convención, un valor negativo. Por el contrario, los sistemas de reacción que adquieren calor del entorno son endotérmicos y tienen valores positivos de ΔH.
>
> La **entropía,** S**,** es una expresión cuantitativa de la aleatoriedad o del desorden de un sistema (véase el Recuadro 1–3). Cuando los productos de una reacción son menos complejos y más desordenados que los reactivos, se afirma que la reacción transcurre con ganancia de entropía.

Las unidades de ΔG y ΔH son joules/mol o calorías/mol (recuérdese que 1 cal son 4,184 J); las unidades de entropía son joules/mol · Kelvin (J/mol · K) (Tabla 13–1).

En las condiciones existentes en los sistemas biológicos (incluyendo temperatura y presión constantes), las variaciones en energía libre, entalpía y entropía están relacionadas cuantitativamente entre sí por la ecuación

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (13\text{–}1)$$

TABLA 13–1 Algunas constantes y unidades físicas utilizadas frecuentemente en termodinámica

Constante de Boltzmann, $\mathbf{k} = 1{,}381 \times 10^{-23}$ J/K
Número de Avogadro, $N = 6{,}022 \times 10^{23}$ mol^{-1}
Constante de Faraday, $\mathcal{F} = 96.480$ J/V · mol
Constante de los gases, $R = 8{,}315$ J/mol · K
(= 1,987 cal/mol · K)
Las unidades de ΔG y ΔH son J/mol (o cal/mol)
Las unidades de ΔS son J/mol · K (o cal/mol · K)
1 cal = 4,184 J
Las unidades de temperatura absoluta, T,
son grados Kelvin, K
25 °C = 298 K
A 25 °C, $RT = 2{,}478$ kJ/mol
(= 0,592 kcal/mol)

en la que ΔG es el cambio de energía libre de Gibbs del sistema de reacción, ΔH es el cambio de entalpía del sistema, T es la temperatura absoluta y ΔS es el cambio de entropía del sistema de reacción. Por convención, ΔS tiene signo positivo cuando aumenta la entropía y ΔH, como se ha indicado anteriormente, tiene signo negativo cuando se libera calor del sistema a su entorno. Cualquiera de estas condiciones, que son típicas de los procesos favorables, tienden a hacer ΔG negativo. De hecho, ΔG de un sistema que reacciona espontáneamente es siempre negativo.

La segunda ley de la termodinámica afirma que la entropía *del universo* aumenta durante todos los procesos químicos y físicos, pero no requiere que el incremento de entropía tenga lugar en el propio *sistema de reacción*. El orden producido en el interior de las células a medida que crecen y se dividen está compensado de sobras por el desorden que se crea en su entorno en el transcurso del crecimiento y división (véase el Recuadro 1-3, caso 2). En pocas palabras, los organismos vivos conservan su orden interno tomando de su entorno energía libre en forma de nutrientes o de luz solar, y devolviendo al entorno una cantidad igual de energía en forma de calor y entropía.

Todas las células precisan fuentes de energía libre

Las células son sistemas isotérmicos ya que funcionan a temperatura prácticamente constante (y a presión constante). El flujo de calor no es una fuente de energía para las células porque el calor puede realizar trabajo solamente cuando pasa a una zona u objeto a menor temperatura. La energía que las células pueden y deben utilizar es la energía libre, descrita por la función de energía libre de Gibbs, G, que permite la predicción de la dirección de las reacciones químicas, su posición exacta de equilibrio y la cantidad de trabajo que pueden llevar a cabo, teóricamente, a temperatura y presión constantes. Las células heterotróficas adquieren energía libre de las moléculas de nutrientes, y las células fotosintéticas la adquieren de la radiación solar absorbida. Ambos tipos de células transforman esta energía libre en ATP y otros compuestos ricos en energía capaces de proporcionar energía para trabajo biológico a temperatura constante.

La variación de energía libre estándar está directamente relacionada con la constante de equilibrio

La composición de un sistema de reacción (una mezcla de reactivos y productos químicos) tiende a continuar cambiando hasta que se llega al equilibrio. A la concentración de equilibrio de reactivos y productos las velocidades de las reacciones directa e inversa son exactamente iguales y no se produce ningún cambio neto más en el sistema. Las concentraciones de reactivos y productos *en el equilibrio* definen la constante de equilibrio, K_{eq} (p. 24). En la reacción general $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$, en donde a, b, c y d son el número de moléculas de A, B, C y D que participan, la constante de equilibrio viene dada por

$$K_{eq} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \qquad (13\text{–}2)$$

en donde [A], [B], [C] y [D] son las concentraciones molares de los componentes de la reacción cuando se encuentra en el punto de equilibrio.

Cuando un sistema de reacción no está en equilibrio, la tendencia a desplazarse hacia el equilibrio representa una fuerza motriz, cuya magnitud se puede expresar como el cambio de energía libre para la reacción, ΔG. En condiciones estándar (298 K = 25 °C), cuando los reactivos y productos se encuentran inicialmente presentes a concentración 1 M o, para los gases, a presiones parciales de 101,3 kilopascales (kPa) o 1 atm, la fuerza propulsora del sistema hacia el equilibrio se define como la variación de energía libre estándar, $\Delta G°$. Según esta definición, el estado estándar de reacciones en las que intervienen iones hidrógeno es $[H^+] = 1$ M, o pH = 0. La mayoría de reacciones bioquímicas tienen lugar en soluciones acuosas bien tamponadas cercanas a pH 7; tanto el pH como la concentración del agua (55,5 M) son prácticamente constantes.

CONVENCIÓN CLAVE: Por conveniencia de cálculo, los bioquímicos definen un estado estándar diferente del utilizado en química y física: en el estado estándar bioquímico, $[H^+]$ es 10^{-7} M (pH 7) y $[H_2O]$ es 55,5 M; para las reacciones en que interviene el Mg^{2+} (incluidas la mayoría de reacciones en que el ATP es el sustrato), $[Mg^{2+}]$ en disolución se considera normalmente constante a 1 mM. ■

Las constantes físicas basadas en este estado estándar bioquímico se denominan **constantes estándar transformadas** y se escriben con una prima (por ejemplo, $\Delta G'°$ y K'_{eq}) para distinguirlas de las constantes sin transformar usadas por químicos y físicos. (Observe que la mayoría de libros de texto utilizan el símbolo $\Delta G°'$ en lugar de $\Delta G'°$. Nuestra utilización de $\Delta G'°$, recomendada por un comité internacional de químicos y bioquímicos, está destinado a resaltar que la energía libre transformada G' es el criterio para el equilibrio.) Por razones de simplicidad, a partir de este momento nos referiremos a las constantes transformadas como **variaciones de energía libre estándar.**

CONVENCIÓN CLAVE: En otra convención simplificadora utilizada por los bioquímicos, cuando H_2O, H^+ o Mg^{2+} son reactivos o productos, no se incluyen sus concentraciones en ecuaciones tales como la Ecuación 13–2 pero no obstante se incorporan en las constantes $\Delta G'^{\circ}$ y K'_{eq}. ■

De la misma manera que K'_{eq} es una constante física característica de cada reacción, también $\Delta G'^{\circ}$ es una constante. Tal como se indicó en el Capítulo 6, existe una relación sencilla entre K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$:

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq} \qquad (13\text{–}3)$$

La variación de energía libre estándar de una reacción química es simplemente una forma matemática alternativa de expresar su constante de equilibrio. La Tabla 13–2 muestra la relación entre $\Delta G'^{\circ}$ y K'_{eq}. Si la constante de equilibrio de una reacción química determinada es 1,0, la variación de energía libre estándar de esta reacción es 0,0 (el logaritmo natural de 1,0 es cero). Si K'_{eq} de una reacción es mayor que 1,0, su $\Delta G'^{\circ}$ es negativo. Si K'_{eq} es menor que 1,0, $\Delta G'^{\circ}$ es positivo. Puesto que la relación entre $\Delta G'^{\circ}$ y K'_{eq} es exponencial, a cambios relativamente pequeños de $\Delta G'^{\circ}$ corresponden grandes cambios en K'_{eq}.

Puede ser útil pensar acerca de la variación de energía libre estándar de una forma diferente. $\Delta G'^{\circ}$ es la diferencia entre el contenido de energía libre de los productos y el contenido en energía libre de los reactivos en condiciones estándar. Cuando $\Delta G'^{\circ}$ es negativa, los productos contienen menos energía libre que los reactivos y la reacción transcurrirá de forma espontánea en condiciones estándar; todas las reacciones químicas tienden a ir en la dirección que da lugar a una disminución de la energía libre del sistema. Un valor de $\Delta G'^{\circ}$ positivo significa que los productos de la reacción contienen más energía libre que los reactivos y, por tanto, esta reacción tenderá a transcurrir en la dirección inversa si empezamos con concentraciones 1,0 M de todos los componentes (condiciones estándar). La Tabla 13–3 resume estos puntos.

TABLA 13–2 Relación entre las constantes de equilibrio y las variaciones de energía libre estándar de reacciones químicas

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta G'^{\circ}$ (kcal/mol)*
10^3	−17,1	−4,1
10^2	−11,4	−2,7
10^1	−5,7	−1,4
1	0,0	0,0
10^{-1}	5,7	1,4
10^{-2}	11,4	2,7
10^{-3}	17,1	4,1
10^{-4}	22,8	5,5
10^{-5}	28,5	6,8
10^{-6}	34,2	8,2

*Aunque julios y kilojulios son las unidades estándar de energía y se utilizan a todo lo largo de este texto, los bioquímicos y los nutricionistas expresan a veces los valores de $\Delta G'^{\circ}$ en kilocalorías por mol. Por tanto, hemos incluido los valores tanto en kilojulios como en kilocalorías en esta tabla y en las Tablas 13-4 y 13-6. Para convertir kilojulios en kilocalorías, divida el número de kilojulios por 4,184.

TABLA 13–3 Relaciones entre K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$ y dirección de las acciones químicas en condiciones estándar

Cuando K'_{eq} es . . .	$\Delta G'^{\circ}$ es . . .	Empezando con todos los componentes 1 M, la reacción . . .
>1,0	negativa	transcurre hacia delante
1,0	cero	se encuentra en el equilibrio
<1,0	positiva	transcurre en sentido inverso

EJEMPLO PRÁCTICO 13–1 Cálculo de $\Delta G'^{\circ}$

Calcule el cambio de energía libre estándar de la reacción catalizada por el enzima fosfoglucomutasa:

$$\text{Glucosa 1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato}$$

dado que si empezamos con glucosa 1-fosfato 20 mM (pero sin glucosa-6-fosfato) la mezcla final en el equilibrio contendrá glucosa 1-fosfato 1,0 mM y glucosa 6-fosfato 19 mM a 25 °C y pH 7,0. La reacción en la dirección de formación de glucosa 6-fosfato ¿transcurre con una pérdida o una ganancia de energía libre?

Solución: Calculemos en primer lugar el valor de la constante de equilibrio:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{glucosa 6-fosfato}]}{[\text{glucosa 1-fosfato}]} = \frac{19\,\text{mM}}{1{,}0\,\text{mM}} = 19$$

Podemos ahora calcular la variación de energía libre estándar:

$$\begin{aligned}\Delta G'^{\circ} &= -RT \ln K'_{eq} \\ &= -(8{,}315\,\text{J/mol}\cdot\text{K})(298\,\text{K})(\ln 19) \\ &= -7{,}3\,\text{kJ/mol}\end{aligned}$$

Dado que la variación de energía libre estándar es negativa, la conversión de la glucosa 1-fosfato a glucosa 6-fosfato transcurre con una pérdida (liberación) de energía libre. (En la reacción inversa, $\Delta G'^{\circ}$ tiene la misma magnitud pero signo *opuesto*.)

La Tabla 13–4 muestra las variaciones de energía libre estándar de varias reacciones químicas representativas. Obsérvese que la hidrólisis de ésteres, amidas, péptidos y glucósidos sencillos, así como los reordenamientos y eliminaciones transcurren con variaciones de energía libre estándar relativamente pequeñas, mientras que la hidrólisis de anhídridos de ácido tiene lugar con disminuciones relativamente grandes de energía libre estándar. La oxidación completa de compuestos orgánicos tales como la glucosa o el palmitato a CO_2 y H_2O, que en las células requiere muchos pasos, transcurre con descensos de la energía libre estándar muy grandes. No obstante, las variaciones de energía libre estándar tales como las de la Tabla 13–4 nos dicen cuánta energía libre está dispo-

TABLA 13–4 Variaciones de energía libre estándar de algunas reacciones químicas

Tipo de reacción	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta G'^{\circ}$ (kcal/mol)
Reacciones de hidrólisis		
Anhídridos de ácido		
Anhídrido acético + $H_2O \longrightarrow$ 2 acetato	−91,1	−21,8
ATP + $H_2O \longrightarrow$ ADP + P_i	−30,5	−7,3
ATP + $H_2O \longrightarrow$ AMP + PP_i	−45,6	−10,9
PP_i + $H_2O \longrightarrow 2P_i$	−19,2	−4,6
UDP-glucosa + $H_2O \longrightarrow$ UMP + glucosa 1-fosfato	−43,0	−10,3
Ésteres		
Acetato de etilo + $H_2O \longrightarrow$ etanol + acetato	−19,6	−4,7
Glucosa 6-fosfato + $H_2O \longrightarrow$ glucosa + P_i	−13,8	−3,3
Amidas y péptidos		
Glutamina + $H_2O \longrightarrow$ glutamato + NH_4^+	−14,2	−3,4
Glicilglicina + $H_2O \longrightarrow$ 2 glicina	−9,2	−2,2
Glucósidos		
Maltosa + $H_2O \longrightarrow$ 2 glucosa	−15,5	−3,7
Lactosa + $H_2O \longrightarrow$ glucosa + galactosa	−15,9	−3,8
Reordenamientos		
Glucosa 1-fosfato $\longrightarrow$ glucosa 6-fosfato	−7,3	−1,7
Fructosa 6-fosfato $\longrightarrow$ glucosa 6-fosfato	−1,7	−0,4
Eliminación de agua		
Malato $\longrightarrow$ fumarato + H_2O	3,1	0,8
Oxidaciones con oxígeno molecular		
Glucosa + $6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$	−2.840	−686
Palmitato + $23O_2 \longrightarrow 16CO_2 + 16H_2O$	−9.770	−2.338

nible en una reacción en *condiciones estándar*. Para describir la energía liberada en las condiciones que existen en las células, es necesaria una expresión para la variación de energía libre *real*.

El cambio de energía libre real depende de las concentraciones de reactivos y productos

Hemos de tener cuidado en distinguir entre dos cantidades diferentes: la variación de energía libre real, ΔG, y el cambio de energía libre estándar, $\Delta G'^{\circ}$. Cada reacción química tiene una variación de energía libre estándar característica, que puede ser positiva, negativa o cero, según sea la constante de equilibrio de la reacción. La variación de energía libre estándar nos dice en qué dirección y hasta qué punto debe transcurrir determinada reacción para alcanzar el equilibrio *cuando la concentración inicial de cada componente es 1,0 M*, el pH es 7,0, la temperatura 25 °C y la presión 101,3 kPa (1 atm). Así, $\Delta G'^{\circ}$ es una constante: tiene un valor característico, fijo, para una reacción determinada. Pero la variación de energía libre *real*, ΔG, es función de las concentraciones de reactivos y productos y de la temperatura que se den durante la reacción, que no tienen por qué coincidir necesariamente con las condiciones estándar definidas anteriormente. Además, ΔG de cualquier reacción que transcurra espontáneamente hacia el equilibrio es siempre negativa, se hace menos negativa a medida que transcurre la reacción y es cero en el punto de equilibrio indicando que la reacción ya no puede realizar más trabajo.

ΔG y $\Delta G'^{\circ}$ para cualquier reacción aA + bB $\rightleftharpoons$ cC + dD están relacionadas por la ecuación

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \qquad (13\text{–}4)$$

en la que los términos en rojo son los que se *dan realmente* en el sistema en observación. Los términos de concentración de esta ecuación expresan los efectos denominados más comúnmente acción de masas, mientras que el término $[C]^c[D]^d/[A]^a[B]^b$ se denomina **cociente de acción de masas, *Q*.** Así pues, la Ecuación 13–4 se puede expresar como $\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln Q$. Supongamos, a modo de ejemplo, que la reacción A + B $\rightleftharpoons$ C + D tiene lugar en las condiciones estándar de temperatura (25 °C) y presión (101,3 kPa), pero que las concentraciones de A, B, C y D *no* son iguales y que ninguno de los componentes está presente a la concentración estándar de 1,0 M. Para determinar la variación de energía libre real, ΔG, que tendrá lugar en estas condiciones de concentración no estándar a medida que la reacción transcurre de izquierda a derecha, simplemente colocamos las concentraciones reales de A, B, C y D en la Ecuación 13–4; los valores de *R*, *T* y $\Delta G'^{\circ}$ son los valores estándar. ΔG será negativa y se aproximará a cero a medida que la reacción transcurra debido a que las concentraciones reales de A y B serán

cada vez más pequeñas y las concentraciones de C y D serán cada vez mayores. Obsérvese que cuando una reacción se encuentra en el equilibrio, en donde no existe fuerza impulsora para la reacción en ninguna de las dos direcciones y ΔG es cero, la Ecuación 13–4 se simplifica a

$$0 = \Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\mathrm{C}]_{\mathrm{eq}}[\mathrm{D}]_{\mathrm{eq}}}{[\mathrm{A}]_{\mathrm{eq}}[\mathrm{B}]_{\mathrm{eq}}}$$

o

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{\mathrm{eq}}$$

la ecuación que relaciona la variación de energía libre estándar con la constante de equilibrio (Ec. 13–3).

El criterio para la espontaneidad de una reacción es el valor de ΔG, no $\Delta G'^{\circ}$. Una reacción con $\Delta G'^{\circ}$ positiva puede transcurrir en la dirección directa *si* ΔG *es negativa*. Esto es posible si el término RTln([productos]/[reactivos]) de la Ecuación 13–4 es negativo y tiene un valor absoluto mayor que $\Delta G'^{\circ}$. Por ejemplo, la eliminación inmediata de los productos de una reacción puede mantener el cociente [productos]/[reactivos] muy por debajo de 1, de forma que el término RTln([productos]/[reactivos]) tenga un valor negativo grande. $\Delta G'^{\circ}$ y ΔG son expresiones de la cantidad *máxima* de energía libre que una reacción dada puede, *teóricamente*, suministrar (una cantidad de energía que sólo se podría utilizar si hubiera disponible un dispositivo perfectamente eficiente que la capturase o la aprovechase). Puesto que un dispositivo tal no es posible (una parte de la energía libre siempre se pierde en forma de entropía durante cualquier proceso), la cantidad de trabajo realizada por la reacción a temperatura y presión constantes siempre es menor que la cantidad teórica.

Otro aspecto importante es que algunas reacciones que son termodinámicamente favorables (es decir, aquellas para las que $\Delta G'^{\circ}$ es grande y negativa) no tienen lugar a velocidades observables. Por ejemplo, la combustión de la leña a CO_2 y H_2O es muy favorable termodinámicamente, pero la leña es estable durante años debido a que la energía de activación (véanse las Figs. 6–2 y 6–3) para la reacción de combustión es superior a la energía disponible a temperatura ambiente. Si se suministra la energía de activación necesaria (con una cerilla encendida, por ejemplo), empieza la combustión, convirtiendo la madera en los productos CO_2 y H_2O más estables, al tiempo que se libera energía en forma de calor y luz. El calor liberado por esta reacción exotérmica proporciona la energía de activación para la combustión de regiones adyacentes de la leña; el proceso se autoperpetúa.

En las células vivas, las reacciones que serían extremadamente lentas *si no estuviesen catalizadas*, se consigue que tengan lugar, no suministrando calor adicional, sino disminuyendo la energía de activación con un enzima. Un enzima proporciona una ruta de reacción alternativa con una energía de activación más baja que la de la reacción sin catalizar, de modo que a temperatura ambiente una gran parte de las moléculas de sustrato tienen suficiente energía térmica para superar la barrera de activación, y la velocidad de reacción aumenta de forma espectacular. *La variación de energía libre de una reacción es independiente de la ruta por la que discurra la reacción*; sólo depende de la naturaleza y la concentración de los reactivos iniciales y de los productos finales. *Los enzimas no pueden por lo tanto cambiar las constantes de equilibrio*; pero pueden aumentar la *velocidad* a la que se da la reacción en la dirección dictada por la termodinámica (véase la Sección 6.2).

Las variaciones de energía libre estándar son aditivas

En el caso de dos reacciones químicas secuenciales, $A \rightleftharpoons B$ y $B \rightleftharpoons C$, cada reacción tiene su propia constante de equilibrio y cada una tiene su variación de energía libre estándar característica, $\Delta G_1'^{\circ}$ y $\Delta G_2'^{\circ}$. Como las dos reacciones son secuenciales, B puede eliminarse para dar la reacción global $A \rightleftharpoons C$, que tiene su propia constante de equilibrio y por tanto su propia variación de energía libre estándar, $\Delta G'^{\circ}_{\mathrm{total}}$. *Los valores de* $\Delta G'^{\circ}$ *de reacciones químicas secuenciales son aditivos*. Para la reacción global $A \rightleftharpoons$ $\Delta G'^{\circ}_{\mathrm{total}}$ es la suma de las variaciones de energía libre estándar individuales, $\Delta G_1'^{\circ}$ y $\Delta G_2'^{\circ}$, de las dos reacciones: $\Delta G'^{\circ}_{\mathrm{total}} = \Delta G_1'^{\circ} + \Delta G_2'^{\circ}$.

(1)	$A \longrightarrow B$	$\Delta G_1'^{\circ}$
(2)	$B \longrightarrow C$	$\Delta G_2'^{\circ}$
Suma:	$A \longrightarrow C$	$\Delta G_1'^{\circ} + \Delta G_2'^{\circ}$

Este principio de la bioenergética explica el motivo por el cual una reacción termodinámicamente desfavorable (endergónica) puede ser impulsada en el sentido directo acoplándola a una reacción muy exergónica a través de un intermedio común. Por ejemplo, la síntesis de glucosa 6-fosfato es el primer paso en la utilización de la glucosa por parte de muchos organismos:

$$\text{Glucosa} + \mathrm{P_i} \longrightarrow \text{glucosa 6-fosfato} + \mathrm{H_2O} \qquad \Delta G'^{\circ} = 13{,}8 \text{ kJ/mol}$$

El valor positivo de $\Delta G'^{\circ}$ predice que en condiciones estándar la reacción no tenderá a producirse espontáneamente en la dirección escrita. Otra reacción celular, la hidrólisis de ATP a ADP y Pi, es muy exergónica:

$$\mathrm{ATP} + \mathrm{H_2O} \longrightarrow \mathrm{ADP} + \mathrm{P_i} \qquad \Delta G'^{\circ} = -30{,}5 \text{ kJ/mol}$$

Estas dos reacciones comparten los intermedios comunes P_i y H_2O, motivo por el cual se pueden expresar como reacciones secuenciales:

(1)	Glucosa + $P_i \longrightarrow$ glucosa 6-fosfato + H_2O
(2)	ATP + $H_2O \longrightarrow$ ADP + P_i
Suma:	ATP + glucosa $\longrightarrow$ ADP + glucosa 6-fosfato

La variación de energía libre estándar global se obtiene sumando los valores de $\Delta G'^{\circ}$ de las reacciones individuales:

$$\Delta G'^{\circ} = 13{,}8 \text{ kJ/mol} + (-30{,}5 \text{ kJ/mol}) = -16{,}7 \text{ kJ/mol}$$

La reacción global es exergónica. En este caso, la energía almacenada en el ATP se utiliza para impulsar la síntesis de glucosa 6-fosfato, aunque su formación a partir de glucosa y fosfato inorgánico (P_i) es endergónica. La *ruta* de formación de glucosa 6-fosfato por transferencia de fosforilo desde el ATP es diferente de las dos reacciones anteriores (1) y (2), aunque el resultado neto es el mismo que la suma de las

dos reacciones. En los cálculos termodinámicos, lo único que importa es el estado del sistema en el inicio del proceso y su estado al final; la ruta entre los estados inicial y final es, por tanto, irrelevante.

Hemos dicho que $\Delta G'^{\circ}$ es una forma de expresar la constante de equilibrio de una reacción. Así, para la reacción (1) anterior,

$$K'_{eq_1} = \frac{[\text{glucosa 6-fosfato}]}{[\text{glucosa}][P_i]} = 3{,}9 \times 10^{-3}\text{M}^{-1}$$

Obsérvese que no se incluye el H_2O en esta expresión, ya que se considera que su concentración (55,5 M) permanece invariable durante la reacción. La constante de equilibrio para la hidrólisis del ATP es

$$K'_{eq_2} = \frac{[\text{ADP}][P_i]}{[\text{ATP}]} = 2{,}0 \times 10^{5}\,\text{M}$$

La constante de equilibrio para estas dos reacciones acopladas es

$$K'_{eq_3} = \frac{[\text{glucosa 6-fosfato}][\text{ADP}][P_i]}{[\text{glucosa}][P_i][\text{ATP}]}$$
$$= (K'_{eq_1})(K'_{eq_2}) = (3{,}9 \times 10^{-3}\text{M}^{-1})(2{,}0 \times 10^{5}\text{M})$$
$$= 7{,}8 \times 10^{2}$$

Este cálculo ilustra un aspecto importante acerca de las constantes de equilibrio: aunque los valores de $\Delta G'^{\circ}$ para las dos reacciones que se suman en una tercera son *aditivas*, la K'_{eq} para una reacción que es la suma de otras dos reacciones es el *producto* de los valores de K'_{eq} individuales. Las constantes de equilibrio son *multiplicativas*. Gracias al acoplamiento de la hidrólisis del ATP a la síntesis de la glucosa 6-fosfato, la K'_{eq} para la formación de glucosa 6-fosfato ha aumentado en un factor de 2×10^5.

Esta estrategia del intermedio común es empleada por todas las células vivas en la síntesis de intermedios metabólicos y componentes celulares. Obviamente, la estrategia sólo funciona cuando se dispone de compuestos tales como el ATP de forma continua. En los siguientes capítulos consideraremos varias de las rutas celulares más importantes para la producción de ATP.

RESUMEN 13.1 Bioenergética y termodinámica

- Las células vivas realizan trabajo constantemente. Éstas necesitan energía para mantener sus estructuras altamente organizadas, sintetizar los componentes celulares y generar corrientes eléctricas, entre otros muchos otros procesos.
- La bioenergética es el estudio cuantitativo de las relaciones energéticas y las conversiones de energía en los sistemas biológicos. Las transformaciones de energía biológicas obedecen las leyes de la termodinámica.
- Todas las reacciones químicas están influidas por dos fuerzas: la tendencia a adquirir el estado de enlace más estable (para el que la entalpía, H, es una expresión útil) y la tendencia a conseguir el mayor grado de desorden, expresado como entropía, S. La fuerza impulsora neta en una reacción es ΔG, la variación de energía libre, que representa el efecto neto de estos dos factores: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.
- La variación de energía libre estándar transformada, $\Delta G'^{\circ}$, es una constante física característica de una reacción dada que puede calcularse a partir de la constante de equilibrio para la reacción: $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$.
- La variación de energía libre real, ΔG, depende de $\Delta G'^{\circ}$ y de las concentraciones de reactivos y productos: $\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln$ ([productos]/[reactivos]).
- Cuando ΔG es grande y negativa, la reacción tiende a discurrir en el sentido directo; cuando ΔG es grande y positiva, la reacción tiende a ir en la dirección opuesta; finalmente cuando $\Delta G = 0$, el sistema se encuentra en equilibrio.
- La variación de energía libre de una reacción es independiente de la ruta por la que transcurre la reacción. Las variaciones de energía libre son aditivas; la reacción química neta que resulta de dos reacciones sucesivas que comparten un intermedio común tiene una variación de energía libre global que es la suma de los valores de ΔG de las reacciones individuales.

13.2 Lógica química y reacciones bioquímicas comunes

Las transducciones de energía biológicas que nos interesan aquí son reacciones químicas. La química celular no abarca todas las clases de reacciones que se aprenden en un curso típico de química orgánica. Las reacciones que tienen lugar en los sistemas biológicos, así como las que no tienen lugar, viene dado (1) por su relación con el sistema biológico concreto y (2) sus velocidades. Las dos consideraciones juegan papeles importantes en la forma adquirida por las rutas metabólicas que consideraremos a lo largo de lo que queda del libro. Una reacción pertinente es la que utiliza un sustrato disponible y lo convierte en un producto útil. No obstante, incluso una reacción potencialmente pertinente puede que no tenga lugar. Algunas transformaciones químicas son demasiado lentas (tienen energías de activación demasiado elevadas) para contribuir a los sistemas vivientes incluso con la ayuda de poderosos catalizadores enzimáticos. Las reacciones que sí tienen lugar en la célula representan una caja de herramientas que ha utilizado la evolución para construir las rutas metabólicas que evitan las reacciones "imposibles". Saber reconocer las reacciones plausibles puede ser de gran ayuda para desarrollar un buen dominio de la bioquímica.

Aun así, el número de transformaciones metabólicas que tienen lugar en una célula típica puede parecer abrumador. La mayoría de células tienen la capacidad para llevar a cabo miles de reacciones específicas catalizadas por enzimas: por ejemplo, la transformación de un nutriente sencillo tal como la glucosa en aminoácidos, nucleótidos o lípidos; la extracción de energía a partir de combustibles mediante su oxidación, o la polimerización de subunidades monoméricas en macromoléculas.

Para estudiar estas reacciones es esencial una cierta organización. Existen patrones dentro de la química de la vida; no es necesario aprender todas estas reacciones para aprehender la lógica molecular de la bioquímica. La mayoría de reacciones de las células vivas se encuadran en cinco categorías generales: (1) reacciones que forman o rompen enlaces carbono-carbono; (2) reordenamientos internos, isomerizaciones y eliminaciones; (3) reacciones de radicales libres; (4) transferencias de grupo, y (5) oxidorreducciones. A continuación discutiremos cada uno de estos tipos de reacción en mayor detalle y nos referiremos a ejemplos de cada uno de ellos que se estudiáran en capítulos posteriores. Observe que los cinco tipos de reacciones no son mutuamente excluyentes; así por ejemplo, una reacción de isomerización puede transcurrir a través de un intermedio radical libre.

Sin embargo, antes de continuar deberíamos considerar dos principios químicos básicos. Primero, un enlace covalente consiste en un par de electrones compartido y, en general, el enlace se puede partir de dos formas **(Fig. 13–1)**. En la **rotura homolítica,** cada átomo abandona el enlace en forma de **radical,** llevando un electrón desaparejado. En la **rotura heterolítica,** la más frecuente, un átomo retiene los dos electrones de enlace. En la Figura 13-1 se muestran las especies generadas más frecuentemente al romper enlaces C—C y C—H. Los carbaniones, carbocationes e iones hidruro son muy inestables; esta inestabilidad conforma la química de estos iones, tal como veremos más adelante.

El segundo principio básico es que en muchas reacciones bioquímicas intervienen interacciones entre **nucleófilos** (grupos funcionales ricos en electrones con capacidad para cederlos) y **electrófilos** (grupos funcionales con una carencia de electrones y ávidos de los mismos). Los nucleófilos se combinan con los electrófilos a los que ceden sus electrones. En la **Figura 13–2** se da una lista de nucleófilos y electrófilos comunes. Obsérvese que un átomo de carbono puede actuar como nucleófilo o como electrófilo según sean los enlaces y grupos funcionales que lo rodean.

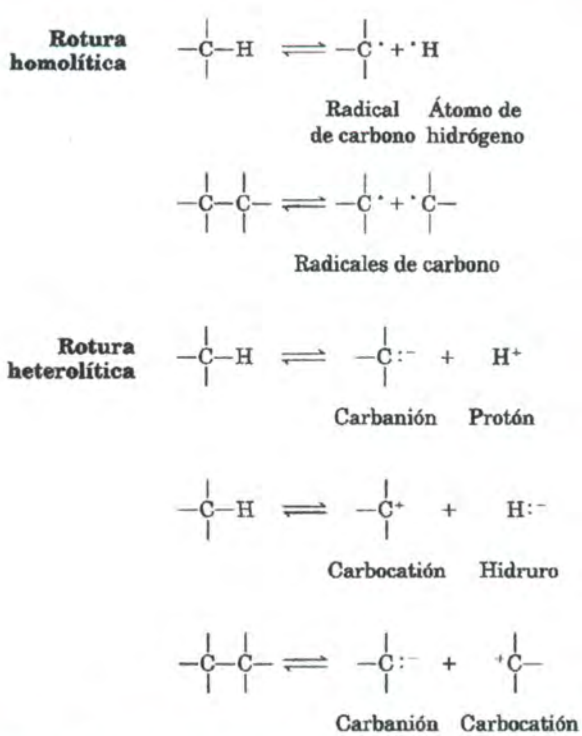


FIGURA 13–1 Dos mecanismos para la rotura de un enlace C—C o C—H. En una rotura homolítica, cada átomo de carbono mantiene uno de los electrones de enlace, formándose radicales carbono (carbonos con electrones desapareados) o átomos de hidrógeno sin carga. En las roturas heterolíticas, uno de los átomos mantiene los dos electrones enlazantes. Esto puede dar lugar a la formación de carbaniones, carbocationes, protones o iones hidruro.

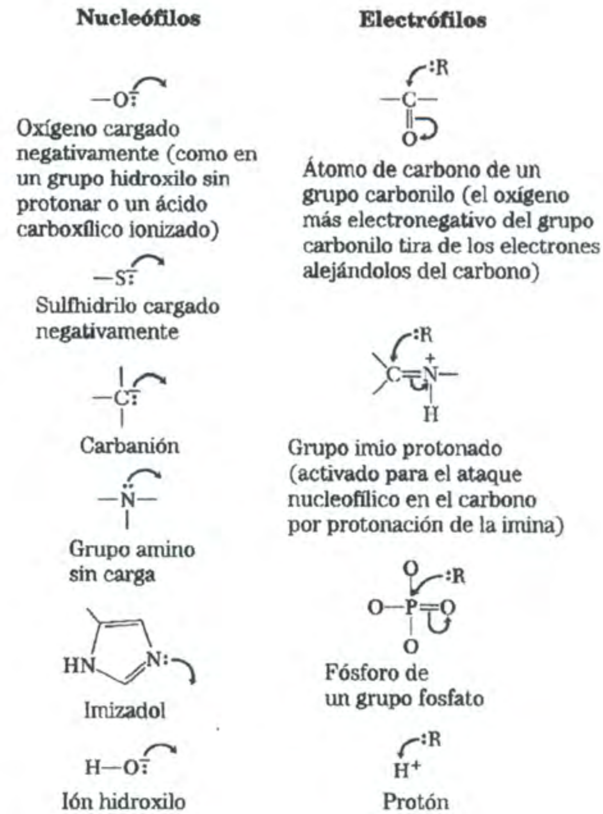


FIGURA 13–2 Nucleófilos y electrófilos comunes en reacciones bioquímicas. Los mecanismos químicos de reacción, que siguen la formación y rotura de enlaces covalentes, están comunicados por puntos o flechas curvas, una convención conocida informalmente como "empujón electrónico". Un enlace covalente consiste en un par de electrones compartido. Los electrones no enlazados que son importantes para el mecanismo de reacción se muestran con puntos (:). Las flechas curvas (⤻) representan el desplazamiento de pares de electrones. Para el desplazamiento de un solo electrón (como en una reacción de radical libre), se utiliza una flecha con una sola punta en la cabeza (tipo anzuelo) (⤻). En la mayoría de pasos en una reacción interviene un par electrónico no compartido.

Reacciones que forman o rompen enlaces carbono-carbono La rotura heterolítica de un enlace C—C forma un **carbanión** y un **carbocatión** (Fig. 13–1). Por el contrario, la formación de un enlace C—C implica la combinación de un carbanión nucleofílico con un carbocatión electrofílico. En general, los carbaniones y carbocationes son tan inestables que su formación como intermedios de reacción puede ser inaccesible energéticamente, incluso con catalizadores enzimáticos. Para el propósito de la bioquímica celular son reacciones imposibles, a menos que se les dé asistencia química en forma de grupos funcionales que contengan átomos electronegativos (O y N) que puedan alterar la estructura electrónica de átomos de carbono

adyacentes de tal modo que se estabilice y facilite la formación de intermedios carbanión y carbocatión.

Los grupos carbonilo son especialmente importantes en las transformaciones químicas de las rutas metabólicas. El carbono de un grupo carbonilo tiene una carga positiva parcial debido a la propiedad eliminadora de electrones por parte del oxígeno carbonílico, por lo que es un carbono electrofílico **(Fig. 13–3a)**. La presencia de un grupo carbonilo puede así facilitar la formación de un carbanión en un carbono adyacente al deslocalizar la carga negativa del carbanión (Fig. 13–3b). Un grupo imino ($C\overset{+}{=}NH_2$) puede realizar una función similar (Fig. 13–3c). La capacidad de los grupos carbonilo e imino para deslocalizar eletrones se puede potenciar aún más por acción de un catalizador ácido o por un ión metálico tal como Mg^{2+} (Fig. 13–3d; véanse también las Figs. 6–21 y 6–23).

La importancia de un grupo carbonilo es evidente en tres clases importantes de reacciones en la que se forman o rompen enlaces C—C **(Fig. 13–4)**: condenaciones aldólicas, condensaciones de ésteres de Claisen y descarboxilaciones. En cada tipo de reacción se estabiliza un intermedio carbanión por un grupo carbonilo, y en muchos casos otro carbonilo proporciona el electrófilo con el que reacciona el carbanión nucleofílico.

Una **condensación aldólica** es una ruta común para la formación de un enlace C—C; la reacción de la aldolasa, que convierte un compuesto de seis carbonos en dos de tres carbonos en la glucólisis es una condensación aldólica en el sentido inverso (véase la Fig. 14–5). En una **condensación de Claisen,** el carbonilo de un tioéster adyacente estabiliza el carbanión; un ejemplo es la síntesis de citrato en el ciclo del ácido cítrico (véase la Fig. 16–9). La descarboxilación también transcurre normalmente a través de la formación de un carbanión estabilizado por un grupo carbonilo; un ejemplo lo constituye la reacción de la acetoacetato descarboxilasa que tiene lugar en la formación de cuerpos cetónicos durante el

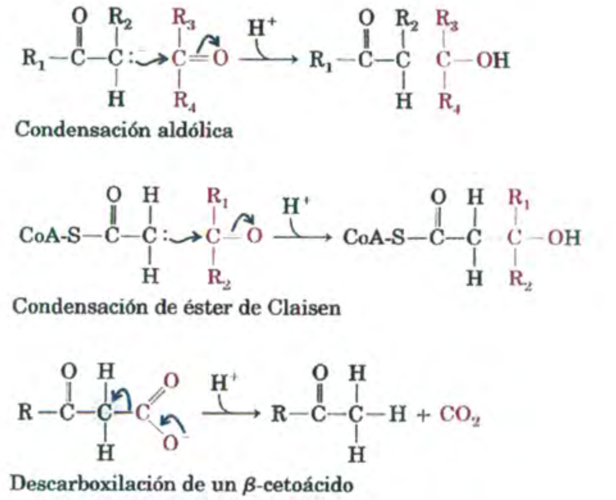


FIGURA 13–4 Algunas reacciones comunes que forman y rompen enlaces C—C en sistemas biológicos. Tanto para la condensación aldólica como la condensación de Claisen, un carbanión actúa como nucleófilo mientras que el carbono de un grupo carbonilo actúa como nucleófilo. El carbanión está estabilizado en cada caso por otro carbonilo en el carbono adyacente. En la reacción de descarboxilación, se forma un carbanión sobre el carbono sombreado en azul al tiempo que sale el CO_2. La reacción no transcurriría a velocidad apreciable sin el efecto estabilizador del carbonilo adyacente al carbono del carbanión. Donde quiera que se muestra un carbanión, se supone una resonancia estabilizadora con el carbonilo adyacente, tal como se muestra en la Figura 13–3b. Una imina (Fig. 13–3c) u otro grupo captador de electrones (incluidos ciertos cofactores enzimáticos tales como el piridoxal) puede reemplazar el grupo carbonilo en la estabilización de carbaniones.

catabolismo de los ácidos grasos (véase la Fig. 17–18). Rutas metabólicas enteras están organizadas alrededor de la introducción de un grupo carbonilo en una localización especial de manera que un enlace carbono-carbono próximo pueda formarse o romperse. En algunas reacciones, una imina o un cofactor tal como el piridoxal fosfato juegan el papel de eliminador de electrones del grupo carbonilo.

El intermedio carbocatión que se produce en algunas reacciones que forman o rompen enlaces C—C se genera por eliminación de un grupo saliente muy bueno, tal como el pirofosfato (véase más adelante las reacciones de transferencia de grupo). Un ejemplo es la reacción de la preniltransferasa **(Fig. 13–5)**, que tiene lugar en una etapa temprana de la ruta de biosíntesis del colesterol.

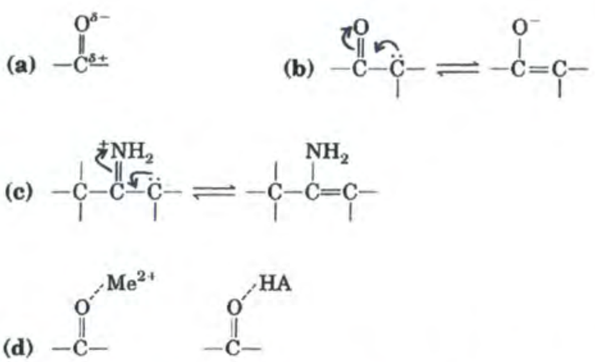


FIGURA 13–3 Propiedades químicas de los grupos carbonilo. **(a)** El átomo de carbono de un grupo carbonilo es un electrófilo debido a la capacidad de retirar electrones del átomo de oxígeno electronegativo, lo que da lugar a una estructura híbrida resonante en la que el carbono tiene una carga positiva parcial. **(b)** Dentro de una molécula, la deslocalización de electrones a un grupo carbonilo estabiliza un carbanión en un carbono adyacente, facilitando su formación. **(c)** Las iminas funcionan de una manera muy semejante a los grupos carbonilo, facilitando la captación de electrones. **(d)** Los grupos carbonilo no siempre funcionan solos; su capacidad como sumideros de electrones a menudo se aumenta por interacción con un ión metálico (Me^{2+}, tal como Mg^{2+}) o un ácido general (HA).

Reorganizaciones internas, isomerizaciones y eliminaciones Otra clase común de reacciones que se dan en las células son las reorganizaciones intramoleculares en las que la redistribución de electrones provoca alteraciones de muchos tipos diferentes sin que cambie el estado de oxidación global de la molécula. Por ejemplo, diferentes grupos de una molécula pueden experimentar oxidación-reducción sin cambio neto en el estado de oxidación de la molécula; grupos en un doble enlace pueden experimentar un reordenamiento *cis-trans* o se pueden trasponer las posiciones de los dobles enlaces. Un ejemplo de isomerización que acarrea oxidación-reducción es la formación de fructosa-6-fosfato a partir de la glucosa-6-fosfato en la

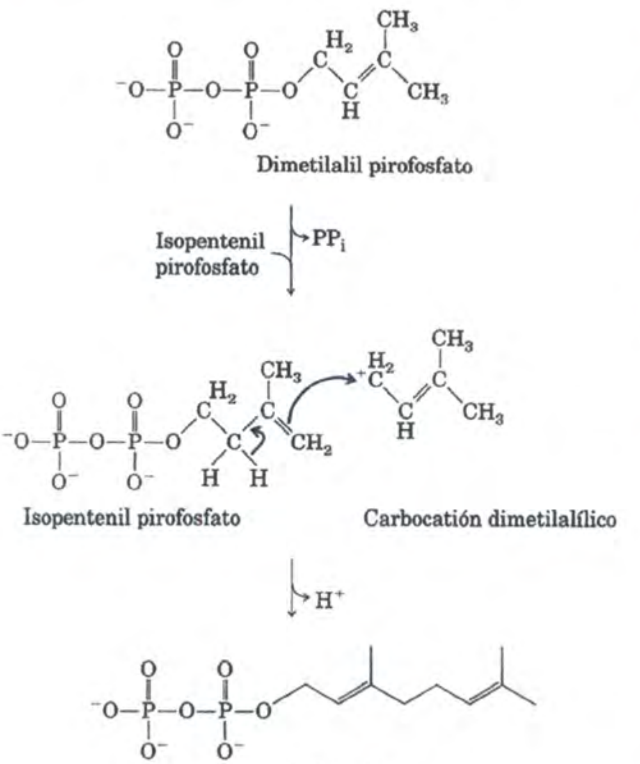
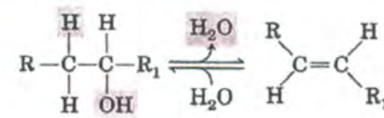


FIGURA 13–5 Carbocationes en la formación de enlaces carbono-carbono. En una de las primeras etapas de la biosíntesis del colesterol, el enzima prenil transferasaes el encargado de catalizar la condensación del isopentenil pirofosfato con el dimetilalil pirofosfato para formar geranil pirofosfato (véase la Fig. 21–36). La reacción se inicia con la eliminación de pirofosfato del dimetilalil pirofosfato generando un carbocatión estabilizado por resonancia con el enlace C=C adyacente.

glucólisis (**Fig. 13–6**; esta reacción se discute en detalle en el Capítulo 14). El C-1 se reduce (de aldehído a alcohol) y el C-2 se oxida (de alcohol a cetona). En la figura 13–6b se muestran los detalles de los movimientos de electrones en este tipo de isomerización. Un reordenamiento *cis-trans* típico es el de la reacción de la prolil *cis-trans* isomerasa en el plegamiento de ciertas proteínas (véase la Fig. 4–7b). Se produce una simple transposición de un enlace C=C durante el metabolismo de un ácido graso tal como el ácido oleico (véase la Fig. 17–9); más adelante veremos ejemplos espectaculares de resituación del doble enlace en la síntesis del colesterol (véase la Fig. 21–33).

Un ejemplo de reacción de eliminación que no afecta el estado de oxidación global es la pérdida de agua de un alcohol que introduce un enlace C=C:



Hay reacciones similares en la eliminación de aminas.

Reacciones de radicales libres La rotura homolítica de enlaces covalentes que genera radicales libres se ha encontrado actualmente en una serie de procesos bioquímicos. Entre ellos las isomerizaciones que utilizan la adenosilcobalamina (vitamina B_{12}) o la *S*-adenosilmetionina, que se inician con un radical 5′-desoxiadenosilo (véase la reacción de la metilmalonil-CoA mutasa en el Recuadro 17–2); ciertas reacciones de descarboxilación iniciada por un radical **(Fig. 13-7)**; algunas reacciones de reductasas tales como la catalizada por la ribonucleótido reductasa (véase la Fig. 22–41), y algunos reordenamientos como el catalizado por la DNA fotoliasa (véase la Fig. 25–27).

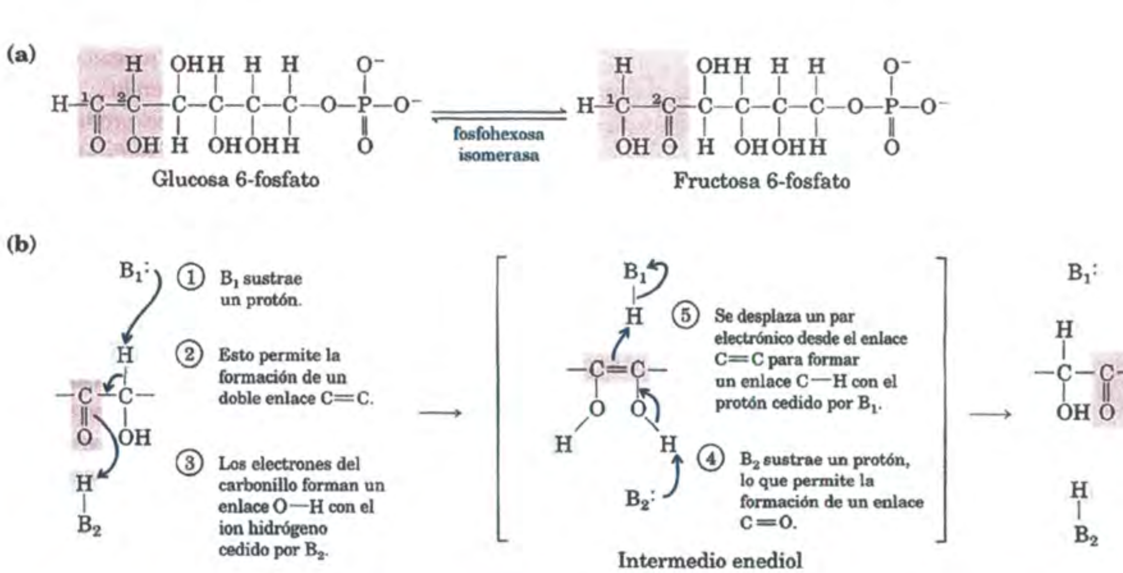
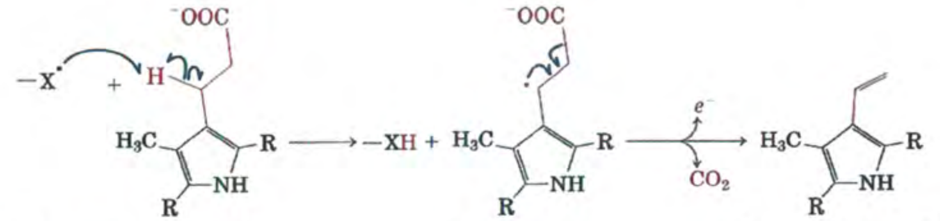


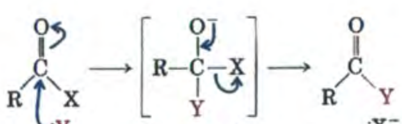
FIGURA 13–6 Reacciones de isomerización y eliminación. (a) Conversión de glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato, una reacción del metabolismo de los azúcares catalizada por la fosfohexosa isomerasa. **(b)** Esta reacción tiene lugar a través de un intermedio enediol. Las flechas azules curvadas representan el movimiento de los electrones de enlace. Los recuadros rosa siguen la ruta de oxidación de izquierda a derecha. B_1 y B_2 son grupos ionizables del enzima; pueden dar y aceptar protones (actuando como ácidos generales o bases generales) mientras transcurre la reacción. Los recuadros rosa indican grupos nucleofílicos; los azules, electrofílicos.



Coproporfirinógeno III — Radical coproporfirinogenil III — Protoporfirinógeno IX

FIGURA 13–7 Reacción de descarboxilación iniciada por un radical libre. La biosíntesis del hemo (véase la Fig. 22–24) en *Escherichia coli* incluye un paso de descarboxilación en la que las cadenas laterales propionilo en el intermedio coproporfirinógeno III se convierten en las cadenas laterales vinilo del protoforinógeno IX. Cuando se hace crecer las bacterias de manera anaeróbica, el enzima coproporfirinógeno III oxidasa independiente de oxígeno, también llamado proteína HemN, provoca la descarboxilación vía el mecanismo de radical libre que se muestra aquí. No se conoce el aceptor del electrón liberado. Por razones de simplicidad, sólo se muestran las porciones pertinentes de las grandes moléculas de coproporfirinógeno III y protoporfirinógeno; las estructuras completas se muestran en la Figura 22–24. Cuando *E. coli* crece en presencia de oxígeno, esta reacción es una descarboxilación oxidativa y es catalizada por un enzima diferente.

Reacciones de transferencia de grupo La transferencia de grupos acilo, glucosilo y fosforilo desde un nucleófilo a otro es frecuente en las células vivas. En la transferencia de grupos acilo interviene generalmente la adición de un nucleófilo al carbono carbonílico de un grupo acilo para formar un intermedio tetraédrico:



Intermedio tetraédrico

La reacción de la quimotripsina es un ejemplo de transferencia de grupo acilo (véase la Fig. 6–21). Las transferencias de glucosilo implican la sustitución nucleofílica en el C-1 de un anillo de azúcar, el cual es el átomo central de un acetal. En principio, la sustitución podría tener lugar vía S_N1 o S_N2, tal como se describe en la Figura 6–25 para el enzima lisozima.

Las transferencias de grupos fosforilo juega un papel especial en las rutas metabólicas; estas reacciones de transferencia se discuten detalladamente en la Sección 13.3. Un tema general en el metabolismo es la unión de un buen grupo saliente a un intermedio metabólico para "activar" este intermedio de cara a reacciones posteriores. Entre los mejores grupos salientes para reacciones de sustitución nucleofílica están el ortofosfato inorgánico (la forma ionizada, a pH neutro del H_3PO_4, que consiste en una mezcla de $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}, abreviado normalmente como P_i) y el pirofosfato inorgánico ($P_2O_7^{4-}$, abreviado PP_i); los ésteres y anhídridos del ácido fosfórico están activados de manera efectiva para la reacción. La sustitución nucleofílica resulta más favorable mediante la unión de un grupo fosforilo a un grupo saliente, como por ejemplo el —OH, que de otro modo sería muy pobre. Las sustituciones nucleofílicas en las que el grupo fosforilo (—PO_3^{2-}) actúa como grupo saliente tienen lugar en centenares de reacciones metabólicas.

El fósforo puede formar cinco enlaces covalentes. La representación convencional del P_i **(Fig. 13–8a)** con tres enlaces P—O y uno P=O es una representación útil pero no muy precisa. En el P_i, hay cuatro enlaces fósforo-oxígeno equivalentes

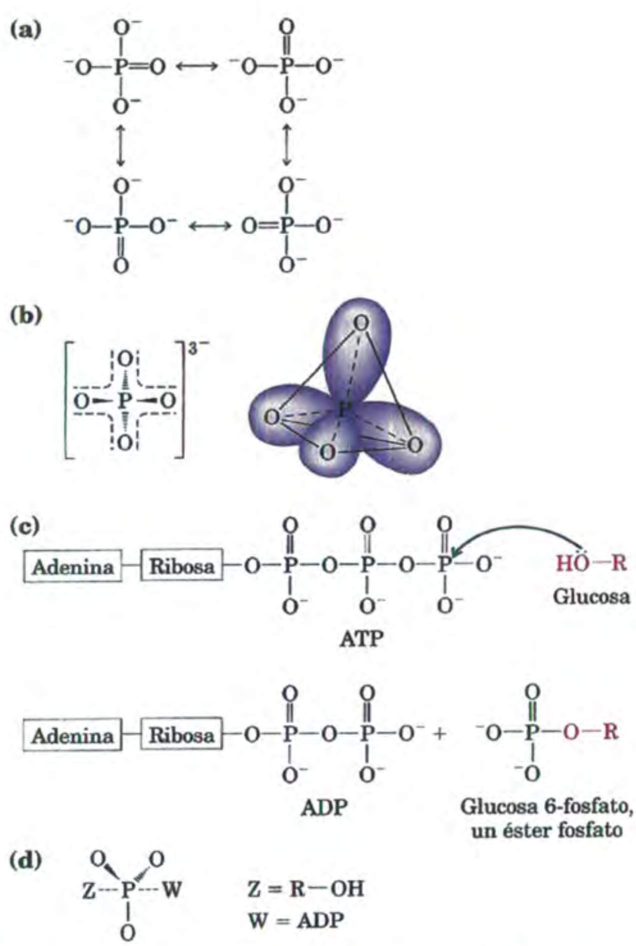


FIGURA 13–8 Maneras alternativas de mostrar la estructura del ortofosfato inorgánico. (a) En una representación (inadecuada) hay tres oxígenos unidos por enlace sencillo al fósforo y un cuarto mediante un doble enlace, permitiendo las cuatro estructuras de resonancia diferentes que se muestran. **(b)** Las estructuras de resonancia pueden ser representadas de una manera más precisa mostrando los cuatro enlaces fósforo-oxígeno con cierto carácter de doble enlace; los orbitales híbridos así representados se estructuran en un tetraedro con el P en su centro. **(c)** Cuando un nucleófilo Z (en este caso, el —OH del C-6 de la glucosa) ataca al ATP, desplaza al ADP (W). En esta reacción S_N2 se forma un intermedio pentacovalente transitorio **(d)**.

que comparten cierto carácter de doble enlace, y el anión tiene una estructura tetraédrica (Fig. 13–8b). Como el oxígeno es más electronegativo que el fósforo, el reparto de electrones no es equitativo: el fósforo central tiene una carga positiva parcial, pudiendo actuar por tanto como un electrófilo. En gran número de reacciones metabólicas se transfiere un grupo fosforilo ($—PO_3^{2-}$) desde el ATP a un alcohol, formando un éster fosfato (Fig. 13–8c), o a un ácido carboxílico, formando un anhídrido mixto. Cuando un nucleófilo ataca el átomo de fósforo electrofílico del ATP, se forma un intermedio con estructura pentacovalente relativamente estable (Fig. 13–8d). Con la marcha del grupo saliente (ADP), se completa la transferencia del grupo fosforilo. La gran familia de enzimas que catalizan transferencias de grupo fosforilo en las que se utiliza el ATP como dador se denominan **quinasas** (del griego *kinein*, "mover"). La hexoquinasa, por ejemplo, "mueve" un grupo fosforilo del ATP a la glucosa.

Los grupos fosforilo no son los únicos grupos que activan moléculas para la reacción. Los tioalcoholes (tioles), en los que se sustituye un átomo de oxígeno de un alcohol por un átomo de azufre, también son buenos grupos salientes. Los tioles activan los ácidos carboxílicos formando tioésteres (ésteres tiólicos. Encontraremos en capítulos posteriores diversas reacciones, incluidas las catalizadas por la ácido graso sintasa en la síntesis de lípidos (véase la Fig. 21–2), en las que la sustitución nucleofílica en el carbono carbonílico de un tioéster tiene como resultado la transferencia del grupo acilo a otra porción de una molécula.

Reacciones de oxidación-reducción Los átomos de carbono pueden existir en cinco estados de oxidación, dependiendo de los elementos con los que compartan electrones **(Fig. 13–9)**, y las transiciones en estos estados son de importancia crucial en el metabolismo (las reacciones de oxidación-reducción son el objeto de la Sección 13.4). En muchas oxidaciones biológicas un compuesto pierde dos electrones y dos iones hidrógeno (es decir, dos átomos de hidrógeno); estas reacciones generalmente se denominan deshidrogenaciones y los enzimas que las catalizan son las deshidrogenasas **(Fig. 13–10)**. En algunas oxidaciones biológicas, aunque no en todas, un átomo de carbono pasa a unirse covalentemente a un átomo de oxígeno. Los enzimas que catalizan estas oxidaciones suelen denominarse oxidasas o, si el átomo de oxígeno proviene directamente del oxígeno molecular (O_2), oxigenasas.

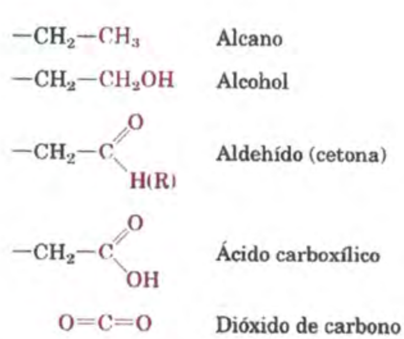


FIGURA 13–9 Estados de oxidación del carbono en las biomoléculas. Cada compuesto se forma por oxidación del carbono marcado en rojo del compuesto inmediatamente superior. El dióxido de carbono es la forma más oxidada de carbono presente en los seres vivos.

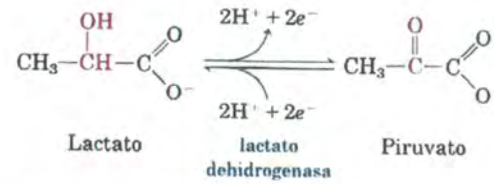


FIGURA 13–10 Una reacción de oxidación-reducción. Aquí se muestra la oxidación del lactato a piruvato. En esta deshidrogenación, dos electrones y dos iones hidrógeno (el equivalente a dos átomos de hidrógeno) se eliminan del C-2 del lactato, un alcohol, para formar piruvato, una cetona. En las células esta reacción está catalizada por la lactato deshidrogenasa y los electrones se transfieren al cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Esta reacción es completamente reversible; el piruvato puede ser reducido por los electrones del cofactor.

Cada oxidación debe ir acompañada de una reducción, en la que un aceptor electrónico adquiere los electrones eliminados por la oxidación. Las reacciones de oxidación suelen liberar energía (piénsese en los incendios forestales, en los que los compuestos de la madera son oxidados por las moléculas de oxígeno del aire). La mayor parte de las células obtienen la energía necesaria para su trabajo celular mediante la oxidación de combustibles metabólicos tales como glúcidos o grasas (los organismos fotosintéticos también pueden captar y utilizar la energía de la luz solar). Las rutas catabólicas (productoras de energía) descritas en los Capítulos 14 a 19 son secuencias de reacciones oxidativas que conducen a la transferencia de electrones de las moléculas de combustible a través de una serie de transportadores de electrones hasta el oxígeno. La alta afinidad del O_2 por los electrones hace que el conjunto del proceso de transferencia de electrones sea altamente exergónico, suministrando la energía que impulsa la síntesis de ATP, objetivo central del catabolismo.

Muchas de las reacciones de estas cinco clases están facilitadas por cofactores, en la forma de coenzimas y metales (vitamina B_{12}, *S*-adenosilmetionina, folato, nicotinamida, así como el hierro, constituyen algunos ejemplos). Los cofactores se unen a los enzimas —en algunos casos reversiblemente, en otros casi irreversiblemente— confiriéndoles la capacidad de promover una clase determinada de química (p. 184). La mayoría de cofactores participan en una estrecha gama de reacciones muy relacionadas. En los capítulos siguientes presentaremos y discutiremos cada cofactor importante en el punto en el que lo encontremos por primera vez. Los cofactores proporcionan otra forma de organizar el estudio de los procesos bioquímicos, ya que las reacciones favorecidas por un cofactor determinado están, generalmente, mecánicamente relacionadas.

Las ecuaciones bioquímicas y químicas no son idénticas

Los bioquímicos escriben las ecuaciones metabólicas de forma simplificada, hecho que es especialmente evidente en las reacciones que las que interviene el ATP. Los compuestos fosforila-

dos pueden existir en diversos estados de ionización y, tal como ya hemos señalado, las diferentes especies pueden unir Mg^{2+}. Por ejemplo, a pH 7,0 y Mg^{2+} 2 mM, el ATP puede existir en las formas ATP^{4-}, $HATP^{3-}$, H_2ATP^{2-}, $MgHATP^-$ y Mg_2ATP. Sin embargo, al pensar acerca del papel biológico del ATP no siempre estamos interesados en todo este detalle, por lo que consideramos el ATP como una entidad constituida por una suma de especies; así pues, escribimos su hidrólisis con la ecuación bioquímica

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i$$

en donde ATP, ADP y P_i son sumas de especies. La correspondiente constante de equilibrio estándar transformada K'_{eq} =[ADP][P_i]/[ATP], depende del pH y del Mg^{2+} libre. Observe que H^+ y Mg^{2+} no aparecen en la ecuación bioquímica porque se mantienen constantes. Así, una reacción bioquímica no equilibra necesariamente H, Mg o carga, aunque equilibra todos los demás elementos que intervienen en la reacción (C, N, O y P, en la anterior ecuación).

Podemos escribir una reacción que *sí* equilibra todos los elementos y la carga. Por ejemplo, cuando se hidroliza el ATP a un pH superior a 8,5 en ausencia de Mg^{2+}, la reacción química se representa así:

$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$

La constante de equilibrio que corresponde a dicha rección, K'_{eq} = [ADP^{3-}][$HPO_4{}^{2-}$][H^+]/[ATP^{4-}], depende sólo de la temperatura, la presión y la fuerza iónica.

Las dos formas de escribir una reacción metabólica son valiosas en bioquímica. Las ecuaciones químicas son necesarias cuando se ha de dar cuenta de todos los átomos y cargas en una reacción, como cuando consideramos el mecanismo de una reacción química. Se utilizan las ecuaciones bioquímicas para determinar la dirección en la que transcurrirá espontáneamente una reacción, dado un pH y una [Mg^{2+}] determinados, o para calcular la constante de equilibrio de tal reacción.

A lo largo de este libro utilizaremos ecuaciones bioquímicas a menos que el foco esté puesto sobre un mecanismo químico y utilizaremos los valores de $\Delta G'^{\circ}$ y K'_{eq} determinados a pH 7 y Mg^{2+} 1mM.

RESUMEN 13.2 Lógica química y reacciones bioquímicas comunes

- Los sistemas de los organismos vivos utilizan un gran número de reacciones químicas que se pueden clasificar en cinco tipos generales.
- Los grupos carbonilo juegan un papel especial en reacciones que forman o rompen enlaces C—C. Intermedios carbanión son comunes y se estabilizan mediante grupos carbonilo adyacentes o, menos frecuentemente, por iminas o ciertos cofactores.
- Una redistribución de electrones puede producir reordenamientos, isomerizaciones y eliminaciones. Tales reacciones incluyen oxidorreducciones intramoleculares, cambios *cis-trans* en el ordenamiento de un doble enlace y transposiciones de dobles enlaces.
- La rotura homolítica de enlaces covalentes que genera radicales libres tiene lugar en algunas rutas, tales como ciertas reacciones de isomerización, descarboxilación, de reductasas y reordenamientos.
- Las reacciones de transferencia de fosforilo son un tipo muy importante en las transferencia de grupo dentro de las células y se requieren para la activación de moléculas que han de intervenir en reacciones que, de otro modo, serían muy desfavorables.
- Las reacciones de oxidación-reducción implican siempre la pérdida o la ganancia de electrones: un reactivo gana electrones reduciéndose, mientras que el otro los pierde y se oxida. Las reacciones de oxidación generalmente liberan energía, siendo por ello importantes en el catabolismo.

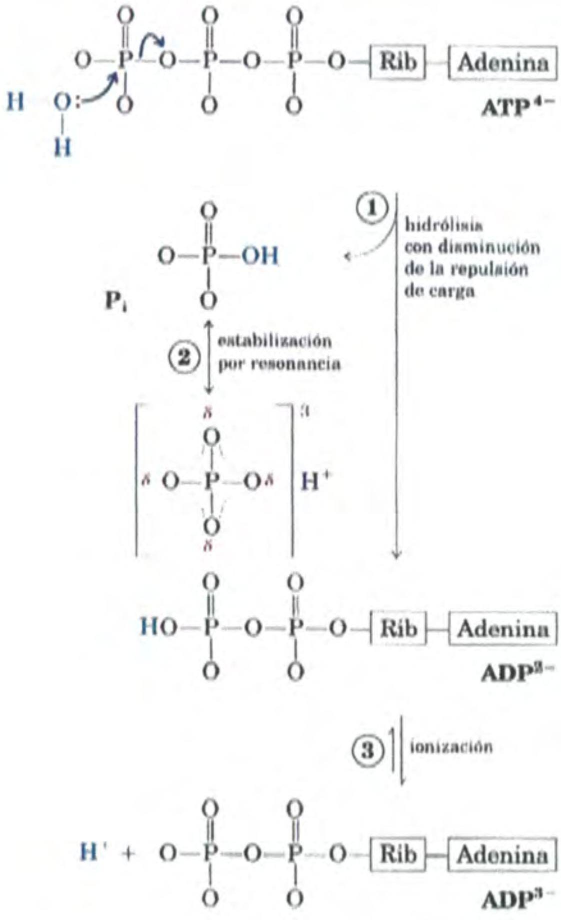
13.3 Transferencia de grupos fosforilo y ATP

Una vez desarrollados algunos principios fundamentales de los cambios de energía en los sistemas químicos y revisados las clases comunes de reacciones, podemos examinar ahora el ciclo de la energía en las células y el papel especial del ATP como la moneda energética que enlaza catabolismo y anabolismo (véase la Fig. 1–28).

Las células heterotróficas obtienen energía libre en una forma química a través del catabolismo de moléculas nutrientes, y utilizan esta energía para producir ATP a partir de ADP y P_i. A continuación el ATP cede parte de su energía química a procesos endergónicos tales como la síntesis de intermedios metabólicos y macromoléculas a partir de precursores más pequeños, el transporte de sustancias a través de membranas contra gradientes de concentración, y el movimiento mecánico. Esta cesión de energía a partir del ATP implica generalmente la participación covalente del ATP en la reacción que ha de ser impulsada, con el resultado final de que el ATP se convierte en ADP y P_i o, en algunas reacciones, en AMP y 2 P_i. Discutiremos a continuacion la base química de los grandes cambios de energía libre que acompañan la hidrólisis del ATP y otros compuestos fosfato de alta energía, y mostraremos que en la mayoría de casos de cesión de energía por el ATP interviene una transferencia de grupo y no simplemente la hidrólisis del ATP. Para ilustrar la gama de transducciones de energía en las que el ATP proporciona la energía, consideraremos la síntesis de macromoléculas ricas en información, el transporte de solutos a través de membranas y el movimiento producido por la contracción muscular.

La variación de energía libre en la hidrólisis del ATP es grande y negativa

La **Figura 13–11** resume la base química de la relativamente grande y negativa energía libre estándar de hidrólisis del ATP. La rotura hidrolítica del enlace anhídrido ácido fosfórico terminal (fosfoanhídrido) del ATP elimina uno de los tres fosfatos



$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{3-} + P_i^{2-} + H^+$$
$$\Delta G'^{\circ} = -30{,}5 \text{ kJ/mol}$$

FIGURA 13–11 Base química de la elevada variación de energía libre asociada a la hidrólisis del ATP. (1) La hidrólisis, al provocar la separación de cargas, elimina la repulsión electrostática entre las cuatro cargas negativas del ATP. (2) El producto fosfato inorgánico (P_i) se estabiliza por la formación de un híbrido de resonancia, en el que cada uno de los cuatro enlaces fósforo-oxígeno tiene el mismo grado de carácter de doble enlace mientras que el ión hidrógeno no está asociado de manera permanente con ninguno de los oxígenos. (En los fosfatos involucrados en enlaces anhídrido o éster tiene lugar también un cierto grado de estabilización por resonancia, pero son posibles menos formas de resonancia que para el P_i.) (3) El producto ADP^{2-} se ioniza inmediatamente, liberando un protón a un medio de $[H^+]$ muy baja (pH 7). Un cuarto factor (no mostrado) que favorece la hidrólisis del ATP es el mayor grado de solvatación (hidratación) de los productos P_i y ADP con relación al ATP, lo que estabiliza todavía más los productos con relación a los reactivos.

cargados negativamente, con lo que disminuye parte de la repulsión electrostática del ATP; el P_i liberado está estabilizado por la formación de varias formas resonantes que no son posibles en el ATP; y el ADP^{2-}, el otro producto directo de hidrólisis, se ioniza inmediatamente, liberando H^+ a un medio de muy baja $[H^+]$ ($\sim 10^{-7}$ M). Puesto que las concentraciones de los productos directos de hidrólisis del ATP en la célula se encuentran muy por debajo de las concentraciones de equilibrio (Tabla 13–5), la acción de masas favorece la reacción de hidrólisis en la célula.

La variación de energía libre para la hidrólisis del ATP es $-30{,}5$ kJ/mol en condiciones estándar, pero la energía libre *real* de hidrólisis (ΔG) del ATP en las células vivas es muy diferente: las concentraciones celulares de ATP, ADP y P_i no son idénticas y son mucho menores que las concentraciones estándar 1,0 M (Tabla 13–5). Además, el Mg^{2+} del citosol se une al ATP y al ADP **(Fig. 13–12)**, y en la mayoría de reacciones enzimáticas en las que interviene el ATP como dador de grupo fosforilo, el verdadero sustrato es $MgATP^{2-}$. La $\Delta G'^{\circ}$ pertinente es, por lo tanto, la de la hidrólisis del $MgATP^{2-}$. Puede calcularse la ΔG para la hidrólisis del ATP a partir de los datos de la Tabla 13–5. La energía libre de hidrólisis *real* del ATP en las condiciones intracelulares se la llama a menudo **potencial de fosforilación, ΔG_p.**

TABLA 13–5 Concentraciones de nucleótidos de adenina, fosfato inorgánico y fosfocreatina en algunas células

	Concentración (mM)*				
	ATP	ADP†	AMP	P_i	PCr
Hepatocito de rata	3,38	1,32	0,29	4,8	0
Miocito de rata	8,05	0,93	0,04	8,05	28
Neurona de rata	2,59	0,73	0,06	2,72	4,7
Eritrocito humano	2,25	0,25	0,02	1,65	0
Célula de *E. coli*	7,90	1,04	0,82	7,9	0

*En el caso de los eritrocitos, las concentraciones son las del citosol (los eritrocitos humanos carecen de núcleo y mitocondrias). En los otros tipos de células los datos corresponden a los contenidos totales de la célula, aunque el citosol y la mitocondria tienen concentraciones muy diferentes de ADP. PCr es fosfocreatina, que se describe en la p. 510.

†Este valor refleja la concentración total; el verdadero valor para el ADP libre puede ser mucho menor (p. 503).

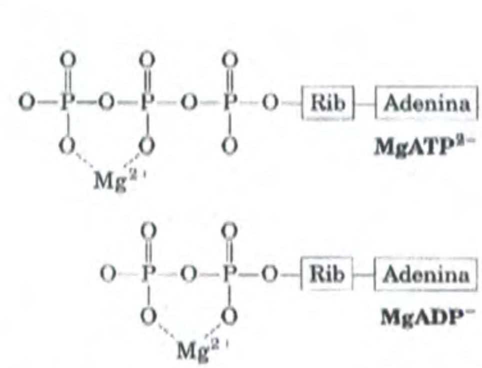


FIGURA 13–12 Mg^{2+} y ATP. La formación de los complejos con Mg^{2+} apantalla parcialmente las cargas negativas e influye sobre la conformación de los grupos fosfato de nucleótidos tales como el ATP y el ADP.

EJEMPLO PRÁCTICO 13–2 Cálculo de ΔG_p

Calcule la energía libre real de hidrólisis de ATP, ΔG_p, en los eritrocitos humanos. La energía libre estándar de hidrólisis del ATP es de $-30{,}5$ kJ/mol, y las concentraciones de ATP, ADP y P_i en los eritrocitos son las que se muestran en la Tabla 13–5. Supongamos que el pH es 7,0 y la temperatura 37 °C (temperatura corporal).

¿Qué nos dice todo ello sobre la cantidad de energía requerida para *sintetizar* ATP en las mismas condiciones celulares?

Solución: Las concentraciones de ATP, ADP y P_i en los eritrocitos humanos son 2,25, 0,25 y 1,65 mM, respectivamente. La energía libre real de hidrólisis del ATP en estas condiciones viene dada por la relación (véase la Ec. 13–4)

$$\Delta G_p = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]}$$

Sustituyendo por los valores adecuados obtenemos

$$\begin{aligned}\Delta G_p &= -30{,}5\ \text{kJ/mol} + \left[(8{,}315\ \text{J/mol}\cdot\text{K})(310\ \text{K}) \ln \frac{(0{,}25 \times 10^{-3})(1{,}65 \times 10^{-3})}{(2{,}25 \times 10^{-3})}\right] \\ &= -30{,}5\ \text{kJ/mol} + (2{,}58\ \text{kJ/mol}) \ln 1{,}8 \times 10^{-4} \\ &= -30{,}5\ \text{kJ/mol} + (2{,}58\ \text{kJ/mol})(-8{,}6) \\ &= -30{,}5\ \text{kJ/mol} - 22\ \text{kJ/mol} \\ &= -52\ \text{kJ/mol}\end{aligned}$$

(Observe que en este caso el resultado final se ha redondeado al número correcto de cifras significativas (52,5 redondeado a 52), según las reglas de redondear el decimal 5 al número par más cercano para evitar el sesgo inherente al "redondeo"). Así, ΔG_p, la variación de energía libre real para la hidrólisis del ATP en el eritrocito intacto (-52 kJ/mol) es mucho mayor que la variación de energía libre estándar ($-30{,}5$ kJ/mol). Por el mismo motivo, la energía libre requerida para *sintetizar* ATP a partir del ADP y P_i en las condiciones existentes en el eritrocito sería 52 kJ/mol.

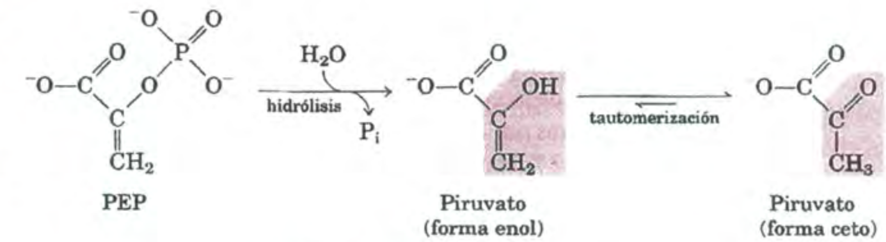
Debido a que las concentraciones de ATP, ADP y P_i varían de un tipo celular a otro, la ΔG_p del ATP también difiere entre células. Además, en una célula determinada, ΔG_p puede variar de un momento a otro, según sean las condiciones metabólicas y de cómo éstas influyan en las concentraciones de ATP, ADP, P_i y H^+ (pH). Se puede calcular la variación de energía libre real de cualquier reacción metabólica tal como tiene lugar en la célula, siempre que se conozcan las concentraciones de todos los reactivos y productos, así como otros factores (pH, temperatura y $[Mg^{2+}]$) que puedan afectar a la variación de energía libre real.

Para complicar aún más la situación, las concentraciones *totales* de ATP, ADP, P_i y H^+ en una célula pueden ser sustancialmente superiores a las concentraciones *libres*, que son los valores termodinámicamente pertinentes. La diferencia se debe a la fuerte unión de ATP, ADP y P_i a proteínas celulares. Por ejemplo, la [ADP] libre en el músculo en reposo se ha calculado de forma variada entre 1 y 37 μM. Utilizando el valor 25 μM en el Ejemplo práctico 13–2, obtendríamos una ΔG_p de –64 kJ/mol. No obstante, el cálculo del valor exacto de ΔG_p es, quizá, menos instructivo que la generalización que podemos hacer sobre los cambios de energía libre reales: in vivo, la energía liberada por la hidrólisis del ATP es mayor que el valor de la variación de energía libre estándar, $\Delta G'^{\circ}$.

En las discusiones que siguen utilizamos $\Delta G'^{\circ}$ de hidrólisis del ATP, porque ello permite una comparación, sobre la misma base, con la energética de otras reacciones celulares. Recuerde, sin embargo, que en las células vivas la cantidad pertinente es ΔG —para la hidrólisis del ATP y cualquier otra reacción— y que puede llegar a ser bastante diferente de $\Delta G'^{\circ}$.

En este punto tenemos que mencionar un punto importante sobre los niveles celulares de ATP. Hemos visto (y lo discutiremos todavía más) que las propiedades químicas del ATP hacen que sea una forma adecuada de moneda energética en las células. Sin embargo, no son solamente las propiedades químicas intrínsecas lo que le confieren esta capacidad para impulsar reacciones metabólicas y otros procesos que requieren energía. Más importante aún es que, en el transcurso de la evolución, ha habido una fuerte presión selectiva hacia mecanismos reguladores que *mantienen las concentraciones celulares de ATP muy por encima de las concentraciones de equilibrio* para la reacción de hidrólisis. Cuando bajan las concentraciones de ATP, no sólo disminuye la *cantidad* de combustible, sino que el combustible *pierde su potencia*: ΔG para su hidrólisis (es decir, el potencial de fosforilación ΔG_p) disminuye.

Tal como se verá en la discusión de las rutas metabólicas que producen y consumen ATP, las células vivas han desarrollado mecanismos elaborados, frecuentemente a expensas de lo que nos podría parecer eficiencia y sentido común, para mantener elevadas concentraciones de ATP.



$$PEP^{3-} + H_2O \longrightarrow \text{piruvato}^{-} + P_i^{2-}$$
$$\Delta G'^{\circ} = -61{,}9 \text{ kJ/mol}$$

FIGURA 13–13 Hidrólisis del fosfoenolpiruvato (PEP). Esta reacción catalizada por la piruvato quinasa va seguida de la tautomerización espontánea del producto, el piruvato. La tautomerización no es posible en el PEP, por lo que los productos de hidrólisis están estabilizados en relación a los reactivos. También tiene lugar la estabilización por resonancia del P_i, tal como se muestra en la Fig. 13–11.

Otros compuestos fosforilados y tioésteres también tienen energías libres de hidrólisis elevadas

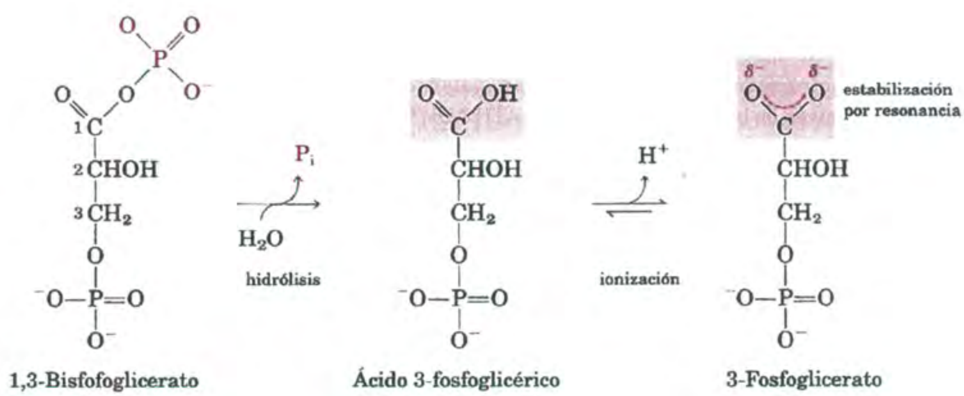
El fosfoenolpiruvato (PEP; **Fig. 13–13**) contiene un enlace éster fosfato que puede ser hidrolizado dando la forma enol del piruvato, y este producto directo de hidrólisis puede tautomerizar inmediatamente a la forma ceto, que es más estable. Debido a que el reactivo (PEP) sólo tiene una forma (enol) y que el producto (piruvato) tiene dos formas posibles, el producto está estabilizado en relación al reactivo. Éste es el factor que más contribuye a la elevada energía libre estándar de hidrólisis del fosfoenolpiruvato: $\Delta G'^{\circ} = -61{,}9$ kJ/mol.

Otro compuesto de tres carbonos, el 1,3-bisfosfoglicerato **(Fig. 13–14)**, contiene un enlace anhídrido entre el grupo carboxilo en C-1 y el ácido fosfórico. La hidrólisis de este acil fosfato va acompañada de una variación grande y negativa de energía libre estándar ($\Delta G'^{\circ} = -49{,}3$ kJ/mol), que también se puede explicar en función de la estructura de reactivo y productos. Cuando se añade H_2O al enlace anhídrido del 1,3-bisfosfoglicerato, uno de los productos directos, el ácido 3-fosfoglicérico, puede perder de forma inmediata un protón para dar lugar al ión carboxilato, 3-fosfoglicerato, que presenta dos formas de resonancia que son igualmente probables (Fig. 13–14).

La eliminación del producto directo (ácido 3-fosfoglicérico) y la formación de un ión estabilizado por resonancia favorece la reacción directa.

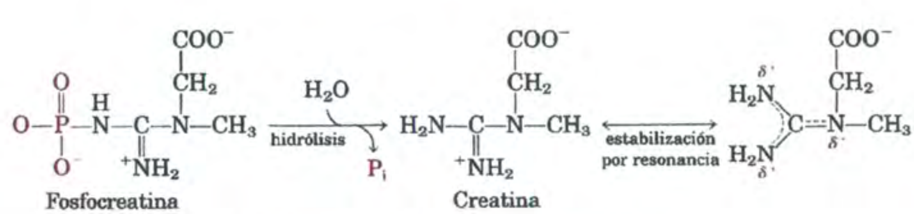
En la fosfocreatina **(Fig. 13–15)**, el enlace P—N puede ser hidrolizado generando creatina libre y P_i. La liberación de P_i y la estabilización por resonancia de la creatina favorece la reacción directa. El cambio de energía libre estándar de la hidrólisis de la fosfocreatina es también grande, en este caso de −43,0 kJ/mol.

En todas estas reacciones que liberan fosfato, las diferentes formas de resonancia posibles para el P_i (Fig. 13–11) estabilizan este producto en relación al reactivo, contribuyendo



$$1{,}3\text{-Bisfofoglicerato}^{4-} + H_2O \longrightarrow 3\text{-fosfoglicerato}^{3-} + P_i^{2-} + H^+$$
$$\Delta G'^{\circ} = -49{,}3 \text{ kJ/mol}$$

FIGURA 13–14 Hidrólisis del 1,3-bisfosfoglicerato. El producto directo de la hidrólisis es el ácido 3-fosfoglicérico, que posee un grupo ácido carboxílico sin disociar, pero la disociación se produce inmediatamente. Esta ionización y las estructuras resonantes que hace posibles estabilizan el producto con relación a los reactivos. La estabilización por resonancia del P_i también contribuye a la variación de energía libre negativa.



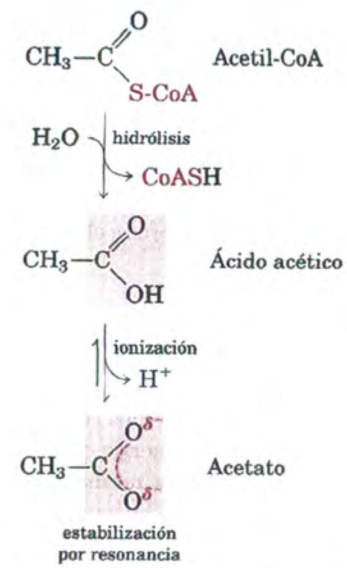
$$\text{Fosfocreatina}^{2-} + H_2O \longrightarrow \text{creatina} + P_i^{2-}$$
$$\Delta G'^{\circ} = -43{,}0 \text{ kJ/mol}$$

FIGURA 13–15 Hidrólisis de la fosfocreatina. La rotura del enlace P—N de la fosfocreatina produce creatina, que está estabilizada por la formación de un híbrido de resonancia. El otro producto, P_i, también está estabilizado por resonancia.

TABLA 13–6 Energía libre estándar de hidrólisis de algunos compuestos fosforilados y del acetil-CoA (un tioéster)

	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta G'^{\circ}$ (kcal/mol)
Fosfoenolpiruvato	−61,9	−14,8
1,3-Bisfosfoglicerato (→ fosfoglicerato + P_i)	−49,3	−11,8
Fosfocreatina	−43,0	−10,3
ADP (→ AMP + P_i)	−32,8	−7,8
ATP (→ ADP + P_i)	−30,5	−7,3
ATP (→ AMP + PP_i)	−45,6	−10,9
AMP (→ adenosina + P_i)	−14,2	−3,4
PP_i (→ $2P_i$)	−19,2	−4,0
Glucosa 1-fosfato	−20,9	−5,0
Fructosa 6-fosfato	−15,9	−3,8
Glucosa 6-fosfato	−13,8	−3,3
Glicerol 3-fosfato	−9,2	−2,2
Acetil-CoA	−31,4	−7,5

Fuente: La mayor parte de datos provienen de Jencks, W.P. (1976) in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edn (Fasman, G.D., ed.), *Physical and Chemical Data*, Vol. 1, pp. 296–304, CRC Press, Boca Raton, FL. El valor de la energía libre de hidrólisis del PP_i proviene de Frey, P.A. & Arabshahi, A. (1995) Standard free-energy change for the hydrolysis of the α-β-phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* **34**, 11,307-11,310.



$$\text{Acetil-CoA} + H_2O \longrightarrow \text{acetato}^- + \text{CoA} + H^+$$
$$\Delta G'^{\circ} = -31{,}4 \text{ kJ/mol}$$

FIGURA 13–16 Hidrólisis del acetil-coenzima A. El acetil-CoA es un tioéster con una variación de energía libre estándar de hidrólisis grande y negativa. Los tioésteres contienen un átomo de azufre en la posición ocupada por un átomo de oxígeno en los ésteres de oxígeno. La estructura completa del coenzima A (CoA o CoASH) se muestra en la Fig. 8–38.

de este modo a un cambio de energía libre ya de por sí negativo. En la Tabla 13–6 se muestran las energías libres estándar de hidrólisis de diversos compuestos fosforilados biológicamente importantes.

Los **tioésteres,** en los que un átomo de azufre sustituye al oxígeno usual en el enlace éster, tienen también energía libres estándar de hidrólisis grandes y negativas. El acetil-coenzima A, o acetil-CoA **(Fig. 13–16)**, es uno de los muchos tioésteres importantes en el metabolismo. El grupo acilo de estos compuestos se activa para reacciones de transacilación, condensación u oxidación-reducción. Los tioésteres tienen una estabilización por resonancia mucho menor que la de los ésteres de oxígeno; en consecuencia, la diferencia en energía libre entre el reactivo y sus productos de hidrólisis, que *están* estabilizados por resonancia, es mayor para los tioésteres que para los ésteres de oxígeno comparables **(Fig. 13–17)**. En ambos casos, la hidrólisis del éster genera un ácido carboxílico, que se puede ionizar y adoptar varias formas de resonancia. En conjunto, estos factores tienen como resultado una $\Delta G'^{\circ}$ grande y negativa (−31,4 kJ/mol) para la hidrólisis del acetil-CoA.

En resumen, en las reacciones de hidrólisis con variaciones de energía libre estándar grandes y negativas, los productos son más estables que los reactivos debido a una o varias de las siguientes razones: (1) la tensión de enlace en los reactivos de-

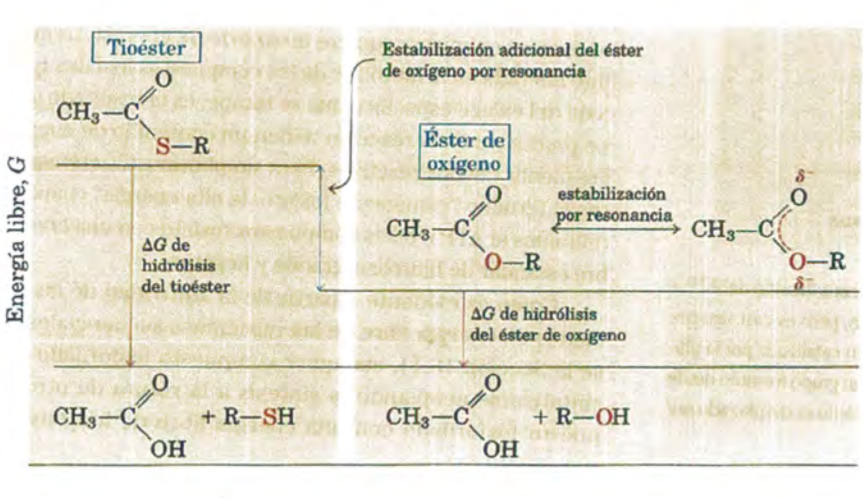


FIGURA 13–17 Energía libre de hidrólisis de los tioésteres y los ésteres de oxígeno. Los *productos* de ambos tipos de reacciones de hidrólisis tienen aproximadamente el mismo contenido de energía libre (G), pero el tioéster tiene un contenido de energía libre superior a la del éster de oxígeno. El solapamiento de orbitales entre los átomos de O y C permite la estabilización por resonancia en los ésteres de oxígeno, pero el solapamiento de orbitales entre los átomos de S y C no es tan bueno, y tiene lugar poca estabilización por resonancia.

bido a repulsión electrostática queda liberada por la separación de carga, tal como sucede en el caso del ATP; (2) los productos están estabilizados por ionización, como en el caso del ATP, acil fosfatos y tioésteres; (3) los productos están estabilizados por isomerización (tautomerización), como sucede con el PEP, y (4) los productos están estabilizados por resonancia, como la creatina liberada a partir de la fosfocreatina, el ión carboxilato liberado de los acil fosfatos y tioésteres y el fosfato (P_i) liberado de enlaces anhídrido o éster.

El ATP proporciona energía por transferencia de grupo y no por simple hidrólisis

A lo largo de este libro encontraremos reacciones o procesos para los que el ATP suministra energía, y la contribución del ATP a estas reacciones se indica normalmente tal como se muestra en la **Figura 13–18a**, con una flecha sencilla que muestra la conversión del ATP en ADP y P_i (o, en algunos casos, de ATP en AMP y pirofosfato, PP_i). Cuando se escriben de esta manera, estas reacciones del ATP parecen simples reacciones de hidrólisis en la que el agua desplaza al P_i (o al PP_i) y uno siente la tentación de afirmar que una reacción dependiente de ATP "está impulsada por la hidrólisis del ATP". Esto *no* es así. La hidrólisis del ATP per se normalmente no consigue nada excepto la liberación de calor, el cual no puede impulsar un proceso químico en un sistema isotérmico. Las flechas de reacción sencillas tales como las de la Fig. 13–18a representan, casi invariablemente, un proceso en dos pasos (Fig. 13–18b) en el que parte de la molécula de ATP, ya sea un grupo fosforilo o pirofosforilo o la porción adenilato (AMP), se transfiere primero a una molécula de sustrato o a un residuo aminoácido de un enzima, quedando unido de manera covalente al sustrato o enzima y elevando así su contenido en energía libre. A continuación, en el segundo paso, se desplaza la porción que contiene el grupo fosfato transferido en el primer paso, generando P_i, PP_i o AMP. Así, el ATP participa *de forma covalente* en la reacción catalizada enzimáticamente a la que aporta energía libre.

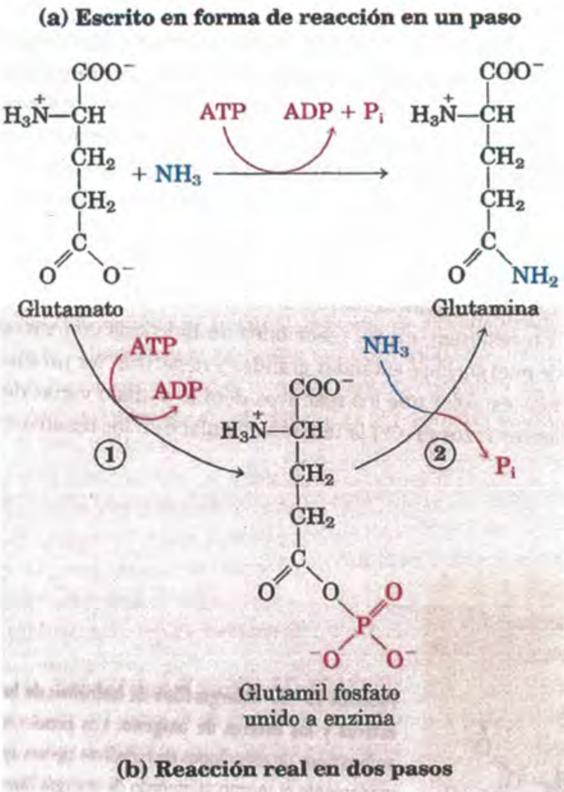


FIGURA 13–18 Hidrólisis del ATP en dos pasos. (a) La contribución del ATP a una reacción se muestra a menudo como un paso único, pero es casi siempre un proceso en dos pasos. **(b)** Se muestra aquí la reacción catalizada por la glutamina sintetasa dependiente de ATP. ① Se transfiere un grupo fosforilo desde el ATP al glutamato, y a continuación ② del grupo fosforilo es desplazado por NH_3 y liberado como P_i.

Sin embargo, algunos procesos *sí implican* la hidrólisis directa del ATP (o GTP). Por ejemplo, la unión no covalente de ATP (o de GTP), seguida de su hidrólisis a ADP (o GDP) y P_i, puede proporcionar la energía para ciclar algunas proteínas entre dos conformaciones, produciendo movimiento mecánico. Esto sucede en la contracción muscular o en el movimiento de enzimas a lo largo del DNA (véase la Fig. 25–35) o de los ribosomas a lo largo del RNA mensajero (véase la Fig. 27–30). Las reacciones dependientes de energía catalizadas por las helicasas, la proteína Rec A, y algunas topoisomerasas (Capítulo 25) también implican hidrólisis directa de enlaces fosfoanhídrido. Las AAA+ATPasas que intervienen en la replicación del DNA, y otros procesos descritos en el Capítulo 25 utilizan la hidrólisis del ATP para ciclar proteínas asociadas entre las formas activa e inactiva. Las proteínas fijadoras de GTP que actúan en rutas de señalización hidrolizan directamente el GTP para impulsar cambios de conformación que finalizan señales desencadenadas por hormonas o por otros factores extracelulares (Capítulo 12).

Los compuestos fosfato que se encuentran en los organismos vivos pueden dividirse de forma algo arbitraria en dos grupos, basados en sus energías libres estándar de hidrólisis (**Fig. 13–19**). Los compuestos de "alta energía" tienen una $\Delta G'^{\circ}$ de hidrólisis más negativa que −25 kJ/mol; los compuestos de "baja energía" tienen una $\Delta G'^{\circ}$ menos negativa. Según este criterio, el ATP, para el que ΔG° de hidrólisis es −30,5 kJ/mol (−7,3 kcal/mol), es un compuesto rico en energía; la glucosa 6-fosfato, con una $\Delta G'^{\circ}$ de hidrólisis de −13,8 kJ/mol (−3,3 kcal/mol), es un compuesto de baja energía.

El término "enlace fosfato rico en energía", utilizado desde hace tiempo por los bioquímicos para describir el enlace P—O roto en las reacciones de hidrólisis, es incorrecto e induce a confusión ya que sugiere de manera equivocada que el enlace por sí mismo contiene la energía. De hecho, la rotura de todos los enlaces químicos requiere un *aporte* de energía. La energía libre liberada en la hidrólisis de los compuestos fosfatos no procede del enlace específico que se rompe; es el resultado de que los productos de la reacción tienen un contenido de energía libre menor que los reactivos. Para simplificar utilizaremos a veces el término "compuesto fosfato de alta energía" cuando nos refiramos al ATP u otros compuestos fosfato con una energía libre estándar de hidrólisis grande y negativa.

Como es evidente a partir de la aditividad de las variaciones de energía libre de las reacciones secuenciales (véase la Sección 13.1), cualquier compuesto fosforilado puede sintetizarse acoplando la síntesis a la rotura de otro compuesto fosforilado con una energía libre de hidrólisis más

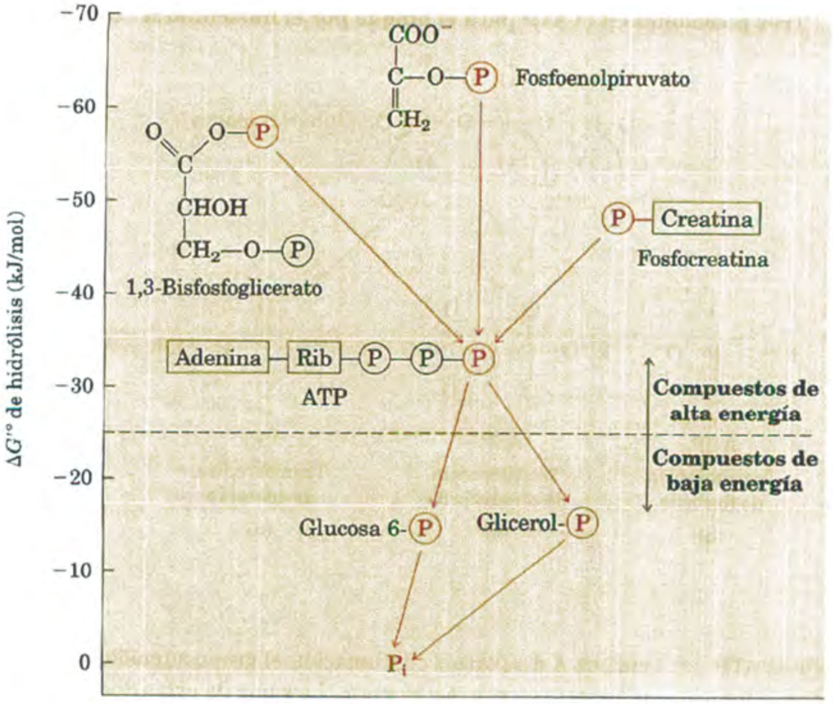


FIGURA 13–19 Clasificación de los compuestos biológicos fosforilados según sus energías libres estándar de hidrólisis. Se muestra el flujo de grupos fosforilo, representados por Ⓟ, desde grupos dadores de fosforilo de elevada energía vía ATP a moléculas aceptoras (tales como glucosa y glicerol) para formar sus derivados fosfatos de baja energía. Este flujo de grupos fosforilo, catalizado por enzimas denominados quinasas, transcurre con una pérdida global de energía libre en las condiciones intracelulares. La hidrólisis de los compuestos fosfato de baja energía libera P_i, que tiene un potencial de transferencia de grupo fosforilo (tal como se define en el texto) aún menor.

negativa. Así por ejemplo, puesto que la escisión de P_i a partir del fosfoenolpiruvato libera más energía de la necesaria para conseguir la condensación de P_i con ADP, la donación directa de un grupo fosforilo del PEP al ADP es termodinámicamente factible:

		$\Delta G'^\circ$ (kJ/mol)
(1)	PEP + H_2O ⟶ piruvato + P_i	−61,9
(2)	ADP + P_i ⟶ ATP + H_2O	+30,5
Suma:	PEP + ADP ⟶ piruvato + ATP	−31,4

Obsérvese que la reacción global anterior se representa como la suma algebraica de las dos primeras reacciones, aunque la reacción global es de hecho una tercera reacción, distinta, en la que no interviene el P_i; el PEP cede un grupo *fosforilo directamente* al ADP. Podemos describir los compuestos fosforilados como poseedores de un potencial de transferencia del grupo fosforilo alto o bajo en base a sus energía libres estándar de hidrólisis (según la Tabla 13–6). El potencial de transferencia del grupo fosforilo del PEP es muy alto, el del ATP es alto y el de la glucosa 6-fosfato es bajo (Fig. 13–19).

Gran parte del catabolismo está dirigido hacia la síntesis de compuestos fosfato de alta energía, pero su formación no es un fin en sí mismo; constituyen una forma de activar una gran variedad de compuestos para transformaciones químicas posteriores. La transferencia de un grupo fosforilo a un compuesto añade efectivamente energía libre en dicho compuesto, de forma que tiene más energía libre para ceder durante sus transformaciones metabólicas posteriores. Hemos descrito anteriormente cómo se consigue la síntesis de glucosa 6-fosfato mediante transferencia del grupo fosforilo del ATP. En el próximo capítulo veremos que esta fosforilación de la glucosa activa o "ceba" la glucosa para reacciones catabólicas que tienen lugar en prácticamente todas las células vivas. Debido a su posición intermedia en la escala de potencial de transferencia de grupo, el ATP puede transportar energía desde compuestos fosfato de alta energía producidos por el catabolismo a compuestos tales como la glucosa, convirtiéndolos en especies más reactivas. El ATP sirve así como moneda de energía universal en todas las células vivas.

Otra característica química del ATP es crucial para su papel en el metabolismo: aunque en solución acuosa el ATP es termodinámicamente inestable y es, por tanto, un buen dador de grupo fosforilo, es *cinéticamente* estable. Debido a las enormes energías de activación (200 a 400 kJ/mol) necesarias para la escisión no catalizada de sus enlaces fosfoanhídrido, el ATP no dona espontáneamente grupos fosforilo al agua o a los otros cientos de aceptores potenciales en la célula. Solamente cuando están presentes enzimas específicos para disminuir la energía de activación tiene lugar la transferencia del grupo fosforilo desde el ATP. La célula es, por tanto, capaz de regular la utilización de la energía transportada por el ATP a través de la regulación de los diversos enzimas que actúan sobre el mismo.

El ATP dona grupos fosforilo, pirofosforilo y adenililo

Las reacciones del ATP son generalmente desplazamientos nucleofílicos S_N2 (véase la Sección 13.2), en los que el nucleófilo puede ser, por ejemplo, el oxígeno de un alcohol o carboxilato o un nitrógeno de la creatina o de la cadena lateral de la arginina o histidina. Cada uno de los tres fosfatos del ATP es susceptible de ataque nucleofílico **(Fig. 13–20)**, y cada posición de ataque conduce a un tipo diferente de producto.

El ataque nucleofílico por un alcohol sobre el fosfato γ (Fig. 13–20a) desplaza ADP y produce un nuevo éster fosfato. Estudios con reactivos marcados con ^{18}O han demostrado que el oxígeno puente en el nuevo compuesto proviene

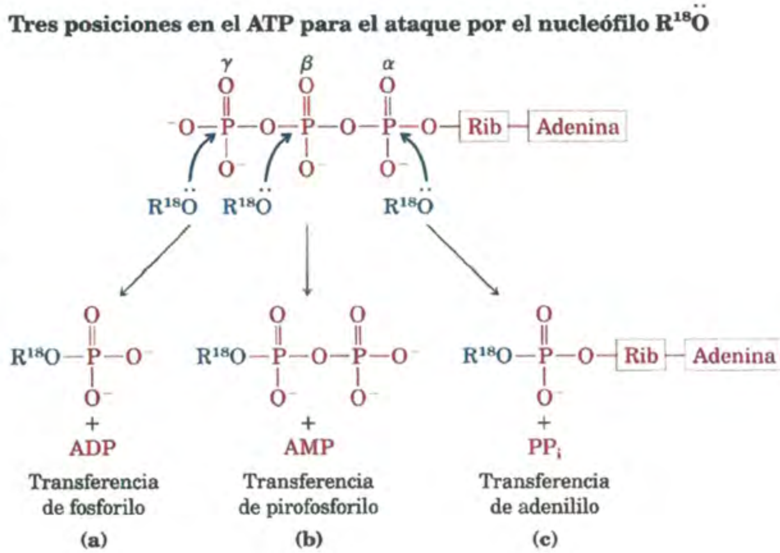


FIGURA 13–20 Reacciones de desplazamiento nucelofílico del ATP. Cualquiera de los tres átomos de P (α, β o γ) puede servir como diana electrofílica para un ataque nucleofílico, en este caso por el nucleófilo marcado R—^{18}O:. El nucleófilo puede ser un alcohol (ROH), un grupo carboxilo ($RCOO^-$), o un fosfoanhídrido (un nucleósido mono- o difosfato, por ejemplo). **(a)** Cuando el oxígeno del nucleófilo ataca la posición γ, se marca el oxígeno enlazante del producto, lo que indica que el grupo transferido desde el ATP es un fosforilo (—PO_3^{2-}), no un fosfato (—OPO_3^{2-}). **(b)** El ataque sobre la posición β desplaza AMP y conduce a la transferencia de un grupo pirofosforilo (no pirofosfato) al nucleófilo. **(c)** El ataque sobre la posición α desplaza PP_i y transfiere el grupo adenililo al nucleófilo.

del alcohol y no del ATP; el grupo transferido desde el ATP es un fosforilo (—PO_3^{2-}). La transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP al glutamato (Fig. 13–18) o a la glucosa (pág. 212) implica el ataque sobre la posición γ de la molécula de ATP.

El ataque sobre el fosfato β del ATP desplaza AMP y transfiere un grupo pirofosforilo (no pirofosfato) al nucleófilo atacante (Fig. 13–20b). Por ejemplo, la formación del 5-fosforribosil-1-pirofosfato (pág. 861), un intermedio clave en la síntesis de nucleótidos, tiene lugar mediante el ataque de un —OH de la ribosa sobre el fosfato β.

El ataque nucleofílico sobre la posición α del ATP desplaza PPi y transfiere adenilato (5′-AMP) en forma de grupo adenililo (Fig. 13-20c); la reacción es una **adenililación** (probablemente una de las palabras más desgarbadas del lenguaje bioquímico). Obsérvese que la hidrólisis del enlace fosfoanhídrido α–β libera considerablemente más energía (~46 kJ/mol) que la hidrólisis del enlace β–γ (~31 kJ/mol) (Tabla 13-6). Además, el PPi formado como subproducto de la adenililación se hidroliza a dos Pi por el enzima ubicuo **pirofosfato inorgánico hidrolasa,** liberando 19 kJ/mol y proporcionando así un "empujón" energético adicional para la reacción de adenililación. De hecho, los dos enlaces fosfoanhídrido del ATP se rompen en la reacción global. Las reacciones de adenililación son, por tanto, termodinámicamente muy favorables. Cuando se utiliza la energía del ATP para impulsar una reacción metabólica especialmente desfavorable, la adenililación es a menudo el mecanismo de acoplamiento energético. La activación de los ácidos grasos es un buen ejemplo de esta estrategia de acoplamiento energético.

El primer paso en la activación de un ácido graso, bien para su oxidación para producir energía bien para su uso en la síntesis de lípidos más complejos, es la formación de su éster tiólico (véase la Fig. 17-5). La condensación directa de un ácido graso con el coenzima A es endergónica, pero la formación del acil graso–CoA se hace exergónica mediante la eliminación por pasos de *dos* grupos fosforilo del ATP. En primer lugar, se transfiere adenilato (AMP) desde el ATP al grupo carboxilo del ácido graso, formando un anhídrido mixto (acil graso adenilato) y liberando PP_i. El grupo tiol del coenzima A desplaza a continuación el grupo adenililo y forma un tioéster con el ácido graso. La suma de estas dos reacciones es energéticamente equivalente a la hidrólisis exergónica del ATP a AMP y PP_i ($\Delta G'^{\circ} = -45{,}6$ kJ/mol) y la formación endergónica del acil graso–CoA ($\Delta G'^{\circ} = 31{,}4$ kJ/mol). La formación del acil graso–CoA se hace energéticamente favorable mediante la hidrólisis del PP_i por la pirofosfato inorgánico hidrolasa. Así, en la activación de un ácido graso se rompen los dos enlaces fosfoanhídrido del ATP. La $\Delta G'^{\circ}$ resultante es la suma de los valores de $\Delta G'^{\circ}$ para la rotura de estos enlaces, a saber, $-45{,}6$ kJ/mol + ($-19{,}22$) kJ/mol:

$$\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{AMP} + 2\text{P}_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -64{,}8\,\text{kJ/mol}$$

La activación de los aminoácidos antes de su polimerización en forma de proteínas (véase la Fig. 27–19) se consigue mediante un conjunto de reacciones análogo en el que una molécula de RNA de transferencia hace las veces de coenzima A. En la luciérnaga se produce una utilización interesante de la rotura de ATP a AMP y PP_i, que usa el ATP como fuente de energía para producir destellos de luz (Recuadro 13–1).

La formación de macromoléculas informativas requiere energía

Cuando se unen precursores sencillos formando polímeros de elevada masa molecular con secuencias definidas (DNA, RNA, proteínas), tal como se describe detalladamente en la Parte III, se requiere energía tanto para la condensación de las unidades monoméricas como para la creación de secuencias *ordenadas*. Los precursores de la síntesis del DNA y del RNA son nucleósido trifosfatos, y la polimerización va acompañada de la rotura de la unión fosfoanhídrido entre los fosfatos α y β, con liberación de PP_i (Fig. 13–20). Las porciones transferidas al polímero creciente en estas reacciones son adenilato (AMP), guanilato (GMP), citidilato (CMP) o uridilato (UMP) en la síntesis del RNA, o sus análogos desoxi (con TMP en lugar de UTP) en la síntesis del DNA. Como hemos señalado antes, en la activación de aminoácidos para la síntesis de proteínas interviene la donación de grupos adenililo del ATP, y tal como veremos en el Capí-

RECUADRO 13–1 Los destellos de la luciérnaga: informes resplandecientes del ATP

La bioluminiscencia requiere cantidades considerables de energía. En la luciérnaga se utiliza el ATP en un conjunto de reacciones que convierten energía química en energía luminosa. En la década de 1950 y a partir de muchos millares de luciérnagas recogidas por niños en Baltimore y alrededores, William McElroy y sus colaboradores de la Johns Hopkins University aislaron los principales componentes bioquímicos: la luciferina, un ácido carboxílico complejo, y la luciferasa, un enzima. La generación de un destello de luz requiere la activación de la luciferina por una reacción enzimática en la que se produce una escisión de pirofosfato del ATP, formando luciferil adenilato (Fig. 1). En presencia de oxígeno molecular y luciferasa, la luciferina experimenta una descarboxilación oxidativa en varios pasos a oxiluciferina. Este proceso va acompañado de emisión de luz. El color del destello de luz difiere según la especie de luciérnaga y parece estar determinado por diferencias en la estructura de la luciferasa. La luciferina se regenera a partir de la oxiluciferina en una serie de reacciones posteriores.

En el laboratorio se utilizan luciferina y luciferasa puras para medir cantidades muy pequeñas de ATP a través de la intensidad del destello de la luz producida. De esta manera se pueden medir concentraciones de ATP tan bajas como unos pocos picomoles (10^{-12} mol). Una extensión informativa de los estudios sobre la luciferasa fue el clonado del gen de la luciferasa en plantas de tabaco. Cuando se riegan con una disolución que contiene luciferina, las plantas brillan en la oscuridad (véase la Fig. 9–29).

La luciérnaga, un escarabajo de la familia Lampíridos.

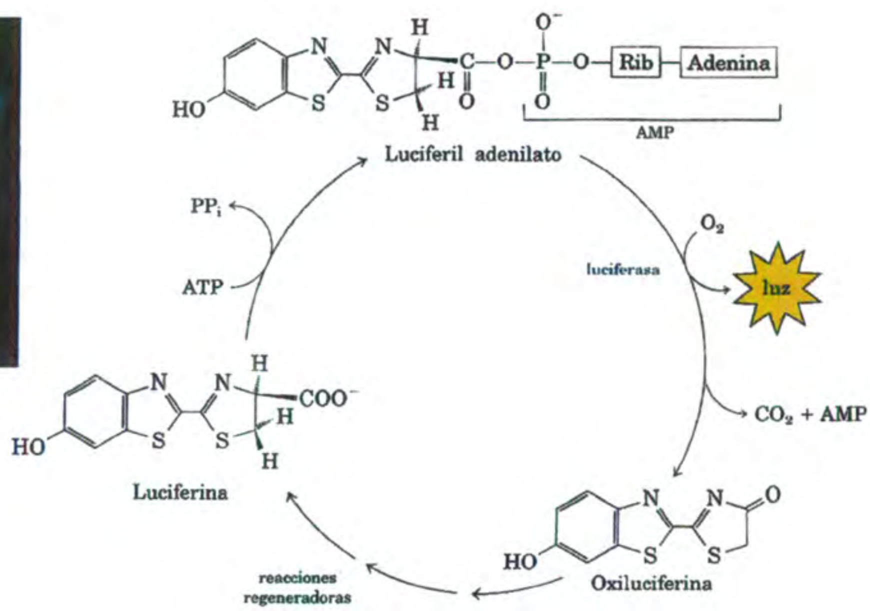


FIGURA 1 Componentes importantes en el ciclo de bioluminiscencia de la luciérnaga.

tulo 27 varios pasos de la síntesis de proteínas en el ribosoma están también acompañados de la hidrólisis de GTP. En todos estos casos la rotura exergónica de un nucleósido trifosfato está acoplada al proceso endergónico de síntesis de un polímero con una secuencia específica.

El ATP aporta energía para el transporte activo y la contracción muscular

El ATP puede suministrar la energía necesaria para transportar un ión o una molécula a través de una membrana a otro compartimiento acuoso en donde su concentración es superior (véase la Fig. 11–38). Los procesos de transporte son grandes consumidores de energía; en el riñón y en el cerebro humanos, por ejemplo, hasta dos tercios de la energía consumida en reposo es utilizada para bombear Na^+ y K^+ a través de las membranas plasmáticas vía la Na^+K^+ ATPasa. El transporte de Na^+ y K^+ está impulsado por la fosforilación y la desfosforilación cíclicas de la proteína transportadora, con el ATP como dador de grupo fosforilo (véase la Fig. 11–37). La fosforilación dependiente de Na^+ de la Na^+K^+ ATPasa fuerza un cambio en la conformación de la proteína, mientras que por su parte la desfosforilación dependiente de K^+ favorece el retorno a la conformación original. Cada uno de los ciclos del proceso de transporte da lugar a la conversión de ATP en ADP y P_i, y es la variación de energía libre de la hidrólisis del ATP la que impulsa todos los cambios cíclicos en la conformación de la proteína que dan lugar al bombeo electrogénico de Na^+ y K^+. Obsérvese que, en este caso, el ATP interacciona de forma covalente a través de la transferencia de grupo fosforilo al enzima y no al sustrato.

En el sistema contráctil de las células del músculo esquelético, la miosina y la actina están especializadas en la transducción de la energía química del ATP en movimiento (véase la Fig. 5–31). El ATP se une fuertemente, aunque no de forma covalente, a una conformación de la miosina, manteniendo la pro-

teína en esta conformación. Cuando la miosina cataliza la hidrólisis de su ATP ligado, el ADP y el P_i se disocian de la proteína, permitiendo que ésta se relaje a una segunda conformación hasta que se une otra molécula de ATP. La unión y posterior hidrólisis del ATP (por la ATPasa de la miosina) proporciona la energía que fuerza cambios cíclicos en la conformación de la cabeza de la miosina. El cambio de conformación de muchas moléculas individuales de miosina da lugar al deslizamiento de las fibrillas de miosina a lo largo de los filamentos de actina (véase la Fig. 5–30), lo que se traduce en la contracción macroscópica de la fibra muscular. Esta producción de movimiento mecánico a expensas del ATP es, como se ha señalado anteriormente, uno de los pocos casos en los que la hidrólisis per se del ATP, y no la transferencia de grupo desde el ATP, es la fuente de energía química en un proceso acoplado.

Las transfosforilaciones entre nucléotidos se dan en todos los tipos celulares

Aunque nos hemos centrado en el ATP como moneda energética celular y dador de grupos fosforilo, los otros nucleósido trifosfatos (GTP, UTP y CTP) y todos los desoxinucleósido trifosfatos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) son energéticamente equivalentes al ATP. Los cambios de energía libre estándar asociados con la hidrólisis de sus enlaces fosfoanhídrido son casi idénticos a los mostrados en la Tabla 13–6 para el ATP. En preparación para sus diversos papeles biológicos, estos otros nucleótidos se generan y mantienen en forma de nucleósido trifosfato (NTP) por transferencia de grupos fosforilo a los correspondientes nucleósido difosfatos (NDP) y monofosfatos (NMP).

El ATP es el compuesto fosfato de alta energía primario producido por el catabolismo, en los procesos de la glucólisis, la fosforilación oxidativa y, en las células fotosintéticas, la fotofosforilación. Varios enzimas transportan a continuación grupos fosforilo desde el ATP a los otros nucleótidos. La **nucleósido difosfato quinasa,** que se encuentra en todas las células, cataliza la reacción

$$\text{ATP} + \text{NDP (o dNDP)} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ADP} + \text{NTP (o dNTP)} \qquad \Delta G'^{\circ} \approx 0$$

Aunque esta reacción es completamente reversible, la proporción relativamente elevada [ATP]/[ADP] en las células normalmente desplaza la reacción hacia la derecha, con formación neta de los NTP y dNTP. El enzima cataliza en realidad una transferencia de grupo fosforilo en dos pasos, que es un ejemplo clásico de mecanismo de doble desplazamiento (ping-pong) (**Fig. 13–21**; véase también la Fig. 6–13b). En primer lugar, la transferencia de un grupo fosforilo desde al ATP a una His del sitio activo produce un intermedio fosfoenzima; a continuación el grupo fosforilo se transfiere desde el residuo Ⓟ–His a un NDP aceptor. Puesto que el enzima no es específico para la base del NDP y funciona igual de bien sobre dNDP que con NDP, puede sintetizar todos los NTP y dNTP a partir de los correspondientes NDP y un suministro de ATP.

Las transferencias de grupo fosforilo desde el ATP provocan la acumulación de ADP; por ejemplo, cuando el músculo se contrae fuertemente, el ADP se acumula e interfiere con la contracción dependiente de ATP. En períodos de demanda intensa de ATP, la célula disminuye la concentración de ADP, al tiempo que adquiere ATP, mediante la reacción de la **adenilato quinasa:**

$$2\text{ADP} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ATP} + \text{AMP} \qquad \Delta G'^{\circ} \approx 0$$

Esta reacción es completamente reversible, de forma que cuando cesa la demanda intensa de ATP el enzima puede reciclar también AMP convirtiéndolo en ADP, el cual a continuación puede fosforilarse a ATP en la mitocondria. Un enzima similar, la guanilato quinasa, convierte GMP en GDP a expensas de ATP. A través de rutas como éstas, la energía conservada en la producción catabólica de ATP se utiliza para suministrar a la célula todos los NTP y dNTP requeridos.

La fosfocreatina (PCr; Fig. 13–15), denominada también creatina fosfato, sirve como una fuente disponible de grupos fosforilo para la síntesis rápida de ATP a partir de ADP. La concentración de PCr en el músculo esquelético es aproximadamente de 30 mM, casi diez veces la concentración de ATP, y en otros tejidos tales como el músculo liso, cerebro y riñón es de 5 a 10 mM. El enzima **creatina quinasa** cataliza la reacción reversible

$$\text{ADP} + \text{PCr} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ATP} + \text{Cr} \qquad \Delta G'^{\circ} = -12{,}5\ \text{kJ/mol}$$

Cuando una demanda repentina de energía agota el ATP, la reserva de PCr se utiliza para reponer ATP a una velocidad consi-

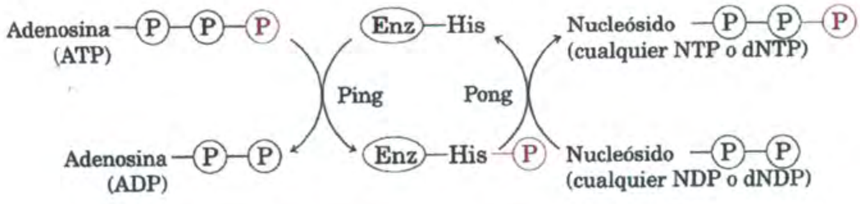
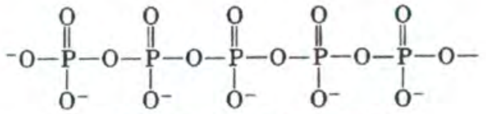


FIGURA 13–21 Mecanismo ping-pong de la nucleósido difosfato quinasa. El enzima une su primer sustrato (ATP en nuestro ejemplo) y se transfiere un grupo fosforilo a la cadena lateral de un residuo His. Sale el ADP, que es reemplazado por otro nucleósido (o desoxinucleósido) difosfato que se convierte en el correspondiente trifosfato por transferencia del grupo fosforilo desde el residuo de fosfohistidina.

derablemente mayor que la que puede sintetizar ATP a través de las rutas catabólicas. Cuando disminuye la demanda de energía, el ATP producido por el catabolismo se utiliza para reponer la reserva de PCr por inversión de la reacción de la creatina quinasa. Los organismos de los phyla inferiores emplean otras moléculas semejantes a la PCr (denominadas colectivamente **fosfágenos**) como depósitos de fosforilo.

El polifosfato inorgánico es un dador potencial de grupos fosforilo

El polifosfato inorgánico, poliP (o (poliP)$_n$, en donde n es el número de residuos ortofosfato), es un polímero lineal compuesto de muchas decenas o centenas de residuos P_i unidos a través de enlaces fosfoanhídrido. Este polímero, presente en todos los organismos, puede acumularse en grandes cantidades en algunas células. Por ejemplo, en la levadura, la cantidad de PoliP que se acumula en las vacuolas representaría, si se distribuyese de manera uniforme por toda la célula, una concentración de 200 mM. (Compárese con las concentraciones de otros dadores de fosforilo mencionados en la Tabla 13–5.)



Polifosfato inorgánico (poliP)

Un papel potencial del PoliP es el de fosfágeno, una reserva de grupos fosforilo que se puede utilizar para generar ATP, de la misma manera que se utiliza la creatina fosfato en el músculo. El poliP tiene aproximadamente el mismo potencial de transferencia de grupos fosforilo que el PP_i. El polifosfato más corto, PP_i ($n = 2$), puede servir como fuente de energía para el transporte activo de H^+ a través de la membrana vacuolar en células vegetales. Para al menos una forma del enzima fosfofructoquinasa de vegetales, el PP_i es el dador de grupos fosforilo, un papel asignado al ATP en animales y microbios (pág. 533). El hallazgo de elevadas concentraciones de poliP en condensados volcánicos y respiraderos de vapor sugiere que podría haber servido como fuente de energía en la evolución prebiótica y celular temprana.

En bacterias el enzima **polifosfato quinasa-1** (PPK-1) cataliza la reacción reversible:

$$\text{ATP} + \text{poliP}_n \xrightleftharpoons{\text{Mg}^{2+}} \text{ADP} + \text{poliP}_{n+1} \qquad \Delta G'^{\circ} = -20\,\text{kJ/mol}$$

a través de un mecanismo en el que interviene un intermedio Ⓟ–His unido al enzima (recuérdese el mecanismo de la nucleósido difosfato quinasa, descrito en la Fig. 13–22). Un segundo enzima, la **polifosfato quinasa-2** (PPK-2), cataliza la síntesis reversible de GTP (o ATP) a partir de polifosfato y GDP o (ADP):

$$\text{GDP} + \text{poliP}_{n+1} \xrightleftharpoons{\text{Mn}^{2+}} \text{GTP} + \text{poliP}_n$$

Se cree que la PPK-2 actúa principalmente en la dirección de síntesis de GTP y ATP y que la PPK-1 lo hace en la dirección de la síntesis de polifosfato. Tanto PPK-1 como PPK-2 están presentes en un gran número de bacterias, incluidas muchas bacterias que son patógenas.

En las bacterias se ha observado que niveles elevados de poliP promueven la expresión de genes que intervienen en la adaptación del organismo a condiciones de inanición u otras amenazas para la supervivencia. En *Escherichia coli*, por ejemplo, el poliP se acumula cuando las células se hacen crecer en un medio con carencia de aminoácidos o de P_i, y esta acumulación confiere una ventaja de supervivencia. La eliminación de los genes de las polifosfato quinasas disminuye la capacidad de ciertas bacterias patógenas de invadir tejidos animales.

Podría demostrarse que los enzimas son, por tanto, dianas adecuadas para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

Ningún gen de la levadura codifica una proteína de tipo PPK, pero se necesitan cuatro genes, no relacionados con los genes de PPK bacterianos, para la síntesis del polifosfato. El mecanismo de síntesis de polifosfato en los eucariotas parece ser muy diferente al de los procariotas.

RESUMEN 13.3 Transferencia de grupos fosforilo y ATP

- El ATP constituye la unión química entre catabolismo y anabolismo. Es la moneda energética de la célula viva. La conversión exergónica del ATP a ADP y P_i, o a AMP y PP_i, está acoplada a muchas reacciones y procesos endergónicos.
- La hidrólisis directa del ATP es la fuente de energía en procesos que son impulsados por cambios de conformación pero, por norma general, no es la hidrólisis del ATP sino la transferencia de un grupo fosforilo, pirofosforilo o adenililo del ATP al sustrato o al enzima la que acopla la energía de rotura del ATP a transformaciones endergónicas de sustratos.
- A través de estas reacciones de transferencia de grupo, el ATP proporciona la energía para las reacciones anabólicas, incluida la síntesis de macromoléculas portadoras de información, y para el transporte de moléculas e iones a través de las membranas contra gradientes de concentración o de potencial eléctrico.
- Para mantener su elevado potencial de transferencia de grupo, la concentración ATP debe mantenerse muy por encima de la concentración de equilibrio mediante reacciones del catabolismo que producen energía.
- Las células contienen otros metabolitos con energías libres de hidrólisis grandes y negativas. Entre ellos se incluyen el fosfoenolpiruvato, el 1,3-bisfosfoglicerato y la fosfocreatina. Estos compuestos de elevada energía, al igual que el ATP, tienen un potencial de transferencia del grupo fosforilo elevado. Los tioésteres también tiene elevadas energías libres de hidrólisis.
- El polifosfato inorgánico, presente en todas las células, puede servir como reserva de grupos fosforilo con elevado potencial de transferencia.

13.4 Reacciones de oxidación-reducción biológicas

La transferencia de grupos fosforilo es una de las características centrales del metabolismo. De igual importancia es otro tipo de transferencia, la transferencia de electrones en las reacciones de oxidación-reducción. Estas reacciones implican la pérdida de electrones por una especie química, que es así oxidada, y la ganancia de electrones por otra, que es reducida. El flujo de electrones en las reacciones de oxidación-reducción es responsable, directa o indirectamente, de todo el trabajo realizado por los organismos vivos. En los organismos no fotosintéticos, la fuente de electrones son compuestos reducidos (alimentos); en los organismos fotosintéticos, el dador de electrones inicial es una especie química excitada por absorción de la luz. La ruta del flujo de electrones en el metabolismo es compleja. Los electrones pasan desde diversos intermedios metabólicos a transportadores de electrones especializados en reacciones catalizadas por enzimas. Los transportadores ceden, a su vez, los electrones a aceptores con afinidad por los electrones más elevada, liberando energía. Las células contienen una serie de transductores de energía molecular que transforman la energía del flujo de electrones en trabajo útil.

Empezaremos discutiendo de qué modo una fuerza electromotriz (fem) puede realizar trabajo y después consideraremos las bases teóricas y experimentales para la determinación de los cambios de energía en las reacciones de oxidación en términos de fem y la relación entre esta fuerza, expresada en voltios, y la variación de energía libre, expresada en joules. Concluiremos con la descripción de las estructuras y la química de oxidación-reducción de los transportadores de electrones especializados más comunes, que encontraremos repetidamente en capítulos posteriores.

El flujo de electrones puede realizar trabajo biológico

Cada vez que utilizamos un motor, una lámpara, un calefactor eléctrico o una chispa para encender la gasolina en un motor de coche, utilizamos el flujo de electrones para realizar trabajo. En el circuito que alimenta un motor, la fuente de electrones puede ser una batería que contiene dos especies químicas que difieren en su afinidad por los electrones. Los cables eléctricos proporcionan una ruta para el flujo de electrones desde la especie química en un polo de la batería, a través del motor, a la especie química en el otro polo de la batería. Debido a que las dos especies químicas difieren en su afinidad por los electrones, éstos fluyen espontáneamente a través del circuito, impulsados por una fuerza proporcional a la diferencia en afinidad electrónica, la **fuerza electromotriz, fem.** La fem (normalmente unos pocos voltios) puede realizar trabajo si se coloca en el circuito un transductor de energía adecuado, en este caso un motor. El motor se puede acoplar a diferentes dispositivos mecánicos para realizar trabajo útil.

Las células vivas tienen un "circuito" biológico análogo, con un compuesto relativamente reducido, tal como la glucosa como fuente de electrones. A medida que la glucosa se oxida enzimáticamente, los electrones liberados fluyen espontáneamente a través de una serie de transportadores de electrones intermedios a otra especie química, tal como el O_2. Este flujo de electrones es exergónico, porque el O_2 tiene una afinidad por los electrones mayor que la que tienen los transportadores de electrones intermedios. La fem resultante proporciona energía a los diversos transductores moleculares de energía (enzimas y otras proteínas) que realizan el trabajo biológico. En la mitocondria, por ejemplo, enzimas ligados a la membrana acoplan el flujo de electrones a la producción de una diferencia de pH transmembrana y a un potencial eléctrico transmembrana, con lo que se consigue trabajo osmótico y eléctrico. El gradiente de protones así formado tiene energía potencial, a veces llamada fuerza protón-motriz por analogía con la fuerza electromotriz. Otro enzima, la ATP sintasa de la membrana mitocondrial interna, utiliza la fuerza protón-motriz para realizar trabajo químico: síntesis de ATP a partir de ADP y P_i a medida que los protones fluyen espontáneamente a través de la membrana. De forma parecida, enzimas localizados en la membrana de *E. coli* convierten la fem en fuerza protón-motriz, que se utiliza seguidamente para accionar el movimiento flagelar. Los principios de la electroquímica que gobiernan los cambios de energía en el circuito macroscópico con un motor y batería se aplican con igual validez a los procesos moleculares que acompañan el flujo de electrones en las células vivas.

Las oxidorreducciones se pueden describir en forma de semirreacciones

Aunque la oxidación y la reducción han de tener lugar conjuntamente, es conveniente al describir transferencias electrónicas considerar las dos mitades de una reacción de oxidación-reducción de forma separada. Por ejemplo, la oxidación del ión ferroso por el ión cúprico:

$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^{+}$$

se puede describir en términos de dos semirreacciones:

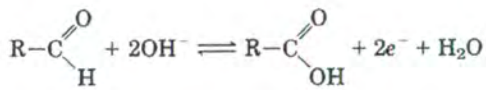
$$(1) \qquad Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^{-}$$
$$(2) \qquad Cu^{2+} + e^{-} \rightleftharpoons Cu^{+}$$

La molécula dadora de electrones en una reacción de oxidación-reducción se denomina agente reductor o reductor; la molécula aceptora de electrones es el agente oxidante o simplemente oxidante. Un agente determinado, tal como un catión hierro en el estado ferroso (Fe^{2+}) o el férrico (Fe^{3+}), funciona como un par reductor-oxidante conjugado (par redox), tal como un ácido y su base correspondiente funcionan como un par ácido-base conjugado. Recuérdese del Capítulo 2 que en las reacciones ácido-base podemos escribir una ecuación general: dador de protones $\rightleftharpoons H^{+}$ + aceptor de protones. En las reacciones redox podemos escribir una ecuación general similar: dador de electrones (reductor) $\rightleftharpoons e^{-}$ + aceptor de electrones (oxidante). En la semirreacción reversible (1) anterior, el Fe^{2+} es el dador de electrones y el Fe^{3+} es el aceptor de electrones; conjuntamente, Fe^{2+} y Fe^{3+} constituyen un **par redox conjugado.**

Las transferencias de electrones en las reacciones de oxidación-reducción de compuestos orgánicos no son fundamentalmente diferentes de las de las especies inorgánicas. En el Capítulo 7 consideramos la oxidación de un azúcar reductor (un aldehído o cetona) por el ión cúprico (véase la Fig. 7–10):

$$R-C(=O)H + 4OH^{-} + 2Cu^{2+} \rightleftharpoons R-C(=O)OH + Cu_2O + 2H_2O$$

Esta reacción global puede expresarse en forma de dos semirreacciones:

(1) 

(2) $$2Cu^{2+} + 2e^- + 2OH^- \rightleftharpoons Cu_2O + H_2O$$

Debido a que se eliminan dos electrones del carbono aldehídico, la segunda semirreacción (la reducción por un electrón del ión cúprico a cuproso) se tiene que multiplicar por dos para equilibrar la ecuación global.

En las oxidaciones biológicas interviene con mucha frecuencia la deshidrogenación

El carbono aparece en las células vivas en diversos estados de oxidación diferentes **(Fig. 13–22)**. Cuando un átomo de carbono comparte un par de electrones con otro átomo (típicamente H, C, S, N u O), lo comparten de manera desigual en favor del átomo más electronegativo. El orden de electronegatividad creciente es H < C < S < N < O. En términos muy simplificados, pero útiles, los electrones enlazantes que se comparten con otro átomo "pertenecen" al átomo más electronegativo. Por ejemplo, en el metano (CH_4), el carbono es más electronegativo que los cuatro hidrógenos a que está unido, y por lo tanto los ocho electrones enlazantes "pertenecen" al átomo de C (Fig. 13–22). En el etano, los electrones del enlace C—C son compartidos por igual, de forma que a cada átomo de carbono le "pertenecen" sólo siete de sus ocho electrones enlazantes. En el etanol, el C-1 es menos electronegativo que el oxígeno al que está unido, y por tanto los dos electrones del enlace C—O "pertenecen" al átomo de O, dejando al C-1 con sólo cinco electrones enlazantes. Con cada pérdida formal de electrones enlazantes "propios", el átomo de carbono ha sufrido una oxidación, incluso cuando no interviene ningún oxígeno, como en la conversión de un alcano (—CH_2—CH_2—) a un alqueno (—CH=CH—). En este caso, la oxidación (pérdida de electrones) coincide con la pérdida de hidrógeno. En los sistemas biológicos, la oxidación es a menudo sinónimo de **deshidrogenación,** y muchos enzimas que catalizan reacciones de oxidación son **deshidrogenasas.** Obsérvese que los compuestos más reducidos de la Figura 13–22 (arriba) son más ricos en hidrógeno que en oxígeno, mientras que los compuestos más oxidados (abajo) tienen más oxígeno y menos hidrógeno.

No en todas las reacciones biológicas de oxidación-reducción interviene el carbono. Por ejemplo, en la conversión de nitrógeno molecular en amoníaco, $6H^+ + 6e^- + N_2 \rightarrow 2NH_3$ los átomos de nitrógeno son reducidos.

Los electrones se transfieren de una molécula (dador de electrones) a otra (aceptor de electrones) de cuatro formas diferentes:

1. Directamente como *electrones*. Por ejemplo, el par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} puede transferir un electrón al par redox Cu^+/Cu^{2+}:

$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^+$$

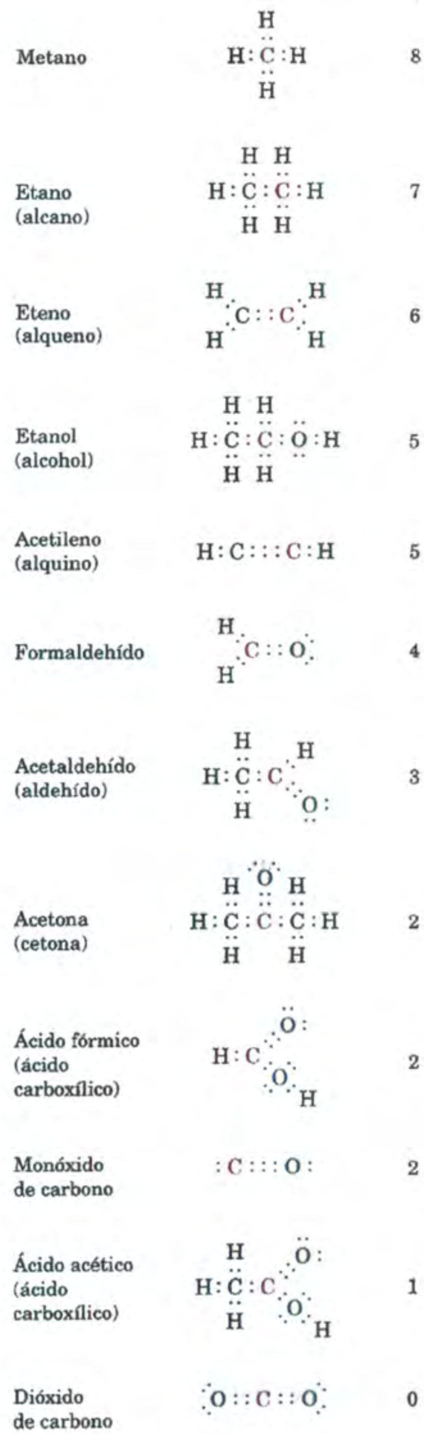


FIGURA 13–22 Estados de oxidación del carbono en la biosfera. Los estados de oxidación se ilustran con algunos compuestos representativos. Fíjese en el carbono en rojo y sus electrones enlazantes. Cuando este carbono esta enlazado al átomo de H, menos electronegativo, ambos electrones enlazantes (en rojo) se asignan al carbono. Cuando el carbono está enlazado a otro carbono, los electrones enlazantes se comparten por igual, de forma que uno de los dos electrones se asigna al carbono en rojo. Cuando el carbono en rojo está unido al átomo de oxígeno, más electronegativo, los electrones enlazantes se asignan al oxígeno. El número a la derecha de cada compuesto es el número de electrones que "pertenecen" al carbono en rojo, una expresión aproximada del estado de oxidación de este carbono. Cuando el carbono en rojo se oxida (pierde electrones), el número se hace menor. Por tanto, el estado de oxidación aumenta de arriba a abajo en la lista.

2. En forma de *átomos de hidrógeno*. Recuérdese que un átomo de hidrógeno consiste en un protón (H^+) y un único electrón (e^-). En este caso podemos escribir la ecuación general

$$AH_2 \rightleftharpoons A + 2e^- + 2H^+$$

en donde AH_2 es el dador de hidrógeno/electrón. (No confundir la reacción anterior con una disociación de ácido en la que interviene un protón pero no un electrón). AH_2 y A constituyen conjuntamente un par redox conjugado (A/AH_2), que puede reducir otro compuesto B (o un par redox B/BH_2) por transferencia de átomos de hidrógeno:

$$AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$$

3. En forma de *ión hidruro* ($:H^-$), que tiene dos electrones. Esto sucede en el caso de las deshidrogenasas ligadas a NAD descritas más adelante.

4. A través de una *combinación directa con oxígeno*. En este caso, el oxígeno se combina con un reductor orgánico y se incorpora de forma covalente en el producto, tal como sucede en la oxidación de un hidrocarburo a alcohol:

$$R-CH_3 + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow R-CH_2-OH$$

El hidrocarburo es el dador de electrones y el átomo de oxígeno es el aceptor de electrones.

Los cuatro tipos de transferencia electrónica se dan en las células. El término neutro **equivalente de reducción** se utiliza normalmente para designar un equivalente de electrones simple que participa en una reacción de oxidación-reducción, sin importar si este equivalente es un electrón per se, un átomo de hidrógeno o un ión hidruro, o si la transferencia de electrones tiene lugar en una reacción con oxígeno para dar un producto oxigenado.

Debido a que las moléculas de combustible biológicas suelen deshidrogenarse enzimáticamente perdiendo *dos* equivalentes de reducción cada vez, y debido a que cada átomo de oxígeno puede aceptar dos equivalentes de reducción, los bioquímicos se refieren, por convención, a la unidad de las oxidaciones biológicas como a dos equivalentes de reducción que pasan de un sustrato al oxígeno.

Los potenciales de reducción son una medida de la afinidad por los electrones

Cuando en una solución se encuentran conjuntamente dos pares redox conjugados, se puede producir espontáneamente la transferencia de electrones desde el dador de electrones de un par al aceptor de electrones del otro. La tendencia a que tenga lugar tal reacción depende de la afinidad relativa del aceptor de electrones de cada par redox por los electrones. El **potencial de reducción estándar, $E°$**, que es una medida (en voltios) de esta afinidad, puede determinarse en un experimento tal como el descrito en la **Figura 13–23**. Los electroquímicos han escogido como estándar de referencia la semirreacción

$$H^+ + e^- \longrightarrow \tfrac{1}{2}H_2$$

Al electrodo en el que tiene lugar esta semirreacción (llamado una semicelda) se le asigna arbitrariamente un potencial de reducción estándar de 0,00 V. Cuando se conecta este electrodo de hidrógeno a través de un circuito externo a otra semicelda en la que están presentes las especies oxidada y reducida en concentración estándar (25 °C cada soluto a 1 M, cada gas a 101,3 kPa), los electrones tienden a fluir a través del circuito externo desde la semicelda con $E°$ más bajo a la semicelda con $E°$ más elevado.

Por convención, a la semicelda que toma electrones de la celda de hidrógeno estándar se le asigna un valor de $E°$ positivo, y a la que dona electrones a la celda de hidrógeno, un valor negativo. Cuando dos semiceldas cualesquiera están conectadas, la que tiene una $E°$ mayor (más positiva) será reducida; tiene un mayor potencial de reducción.

El potencial de reducción de una semicelda depende no sólo de las especies químicas presentes sino también de sus actividades, o por aproximación sus concentraciones. Hace unos cien años, Walther Nernst dedujo una ecuación que relaciona el potencial de reducción estándar ($E°$) con el potencial de reduc-

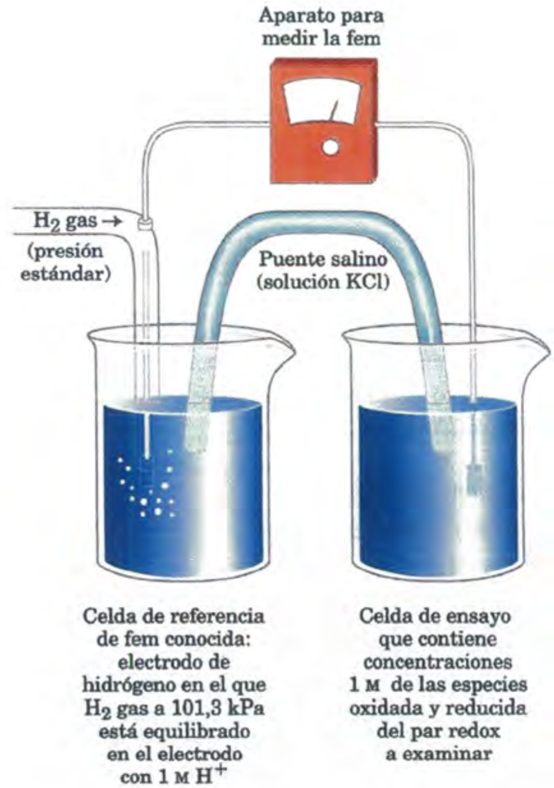


FIGURA 13–23 Medición del potencial de reducción estándar ($E'°$) de un par redox. Los electrones fluyen desde el electrodo de prueba al electrodo de referencia, o viceversa. En último término la semicelda de referencia es el electrodo de hidrógeno, tal como se muestra aquí, a pH 0. La fuerza electromotriz (fem) de este electrodo se toma como 0,00 V. A pH 7 en la celda de referencia (y 25 °C), $E'°$ del electrodo de hidrógeno es −0,414 V. La dirección del flujo de electrones depende de la "presión" o potencial electrónico relativo de las dos celdas. Un puente salino que contiene una solución saturada de KCl proporciona una vía para el movimiento de contraiones entre la celda de prueba y la celda de referencia. A partir de la fem observada y la fem conocida de la celda de referencia, se puede obtener la fem de la celda de ensayo que contiene el par redox. Por convención, la celda que gana electrones tiene el potencial de reducción más positivo.

ción real (E) a cualquier concentración de especies oxidadas y reducidas en la celda:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{[\text{aceptor de electrones}]}{[\text{dador de electrones}]} \qquad (13\text{–}5)$$

en donde R y T tienen su significado habitual, n es el número de electrones transferido y $\mathcal{F}$ es la constante de Faraday (Tabla 13–1). A 298 K (25 °C), esta expresión se simplifica a

$$E = E^\circ + \frac{0{,}026\,\text{V}}{n} \ln \frac{[\text{aceptor de electrones}]}{[\text{dador de electrones}]} \qquad (13\text{–}6)$$

CONVENCIÓN CLAVE: En muchas de las semirreacciones de interés para los bioquímicos intervienen protones. Al igual que en la definición de $\Delta G'^\circ$, los bioquímicos definen el estado estándar para las reacciones de oxidación-reducción a pH 7 y expresan el potencial de reducción como E'°, el potencial de reducción estándar a pH 7 y 25 °C. Por convención, $\Delta E'^\circ$ para cualquier reacción redox viene dado como E'° del aceptor electrónico menos E'° del dador de electrones. ■

Los potenciales de reducción estándar que se dan en la Tabla 13–7 y que se emplean en este libro son valores de E'° y, por consiguiente, son válidos sólo para sistemas a pH neutro. Cada valor representa la diferencia de potencial cuando el par redox conjugado a concentraciones 1 M, 25 °C y pH 7 está conectado con el electrodo estándar de hidrógeno (pH 0). Observe en la Tabla 13–7 que cuando el par conjugado $2H^+/H_2$ a pH 7 está conectado con el electrodo de hidrógeno estándar (pH 0), los electrones tienden a fluir desde la celda de pH 7 a la celda estándar (pH 0); el E'° medido para el par $2H^+/H_2$ es –0,414 V.

Los potenciales de reducción estándar permiten el cálculo de la variación de energía libre

¿Por qué son tan útiles para el bioquímico los potenciales de reducción? Cuando se han determinado los valores de E para cualquier par de semiceldas, en relación al electrodo estándar de hidrógeno, son también conocidos sus potenciales de reducción en relación uno con otro. Uno puede, por tanto, predecir la dirección en la que tenderán a fluir los electrones cuando estas dos semiceldas se conecten a través de un circuito externo, o cuando los componentes de las dos semiceldas estén presentes conjuntamente en la misma solución. Los electrones tienen tendencia a fluir en dirección a la semicelda con el E más positivo, y la fuerza de esta tendencia es proporcional a la diferencia en los potenciales de reducción, ΔE. La energía disponible por este flujo espontáneo de electrones (la variación de energía libre, ΔG, para la reacción de oxidación-reducción) es proporcional a ΔE:

$$\Delta G = -n\mathcal{F}\,\Delta E \quad \text{o} \quad \Delta G'^\circ = -n\mathcal{F}\,\Delta E'^\circ \qquad (13\text{–}7)$$

donde n representa el número de electrones transferidos en la reacción. Con esta ecuación es posible calcular la variación de energía libre real para cualquier reacción de oxidación-reducción a partir de los valores de E'° de una tabla de potenciales de reducción (Tabla 13–7) y la concentración de las especies que intervienen en la reacción.

TABLA 13–7 Potenciales de reducción estándar de algunas semirreacciones biológicamente importantes, a 25 °C y pH 7

Semirreacción	E'° (V)
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$	0,816
$Fe^{3+} + e^- \longrightarrow Fe^{2+}$	0,771
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NO_2^- + H_2O$	0,421
Citocromo f (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo f (Fe^{2+})	0,365
$Fe(CN)_6^{3-}$ (ferricianuro) + $e^- \longrightarrow Fe(CN)_6^{4-}$	0,36
Citocromo a_3 (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo a_3 (Fe^{2+})	0,35
$O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O_2$	0,295
Citocromo a (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo a (Fe^{2+})	0,29
Citocromo c (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo c (Fe^{2+})	0,254
Citocromo c_1 (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo c_1 (Fe^{2+})	0,22
Citocromo b (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo b (Fe^{2+})	0,077
Ubiquinona + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ ubiquinol + H_2	0,045
Fumarato^{2-} + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ succinato^{2-}	0,031
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ (en condiciones estándar, pH 0)	0,000
Crotonil-CoA + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ butiril-CoA	−0,015
Oxalacetato^{2-} + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ malato^{2-}	−0,166
Piruvato$^-$ + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ lactato$^-$	−0,185
Acetaldehído + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ etanol	−0,197
FAD + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow FADH_2$	−0,219*
Glutatión + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ 2 glutatión reducido	−0,23
$S + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2S$	−0,243
Ácido lipoico + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ ácido dihidrolipoico	−0,29
$NAD^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADH	−0,320
$NADP^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADPH	−0,324
Acetoacetato + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ β-hidroxibutirato	−0,346
α-Cetoglutarato + $CO_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ isocitrato	−0,38
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ (at pH 7)	−0,414
Ferredoxina (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ ferredoxina (Fe^{2+})	−0,432

Fuente: Datos principalmente de Loach, R.A. (1976) En *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edn (Fasman, G.D., ed.), *Physical and Chemical Data*, Vol. 1, pp. 122-130, CRC Press, Boca Raton, FL.

* Este es el valor para el FAD libre; el FAD unido a una flavoproteína específica (por ejemplo, succinato deshidrogenasa) posee un E'° diferente que depende del entorno de su proteína.

EJEMPLO PRÁCTICO 13–3 Calculo de $\Delta G'^\circ$ y ΔG de una reacción redox

Calcule la variación de energía libre estándar, $\Delta G'^\circ$, para la reacción en la que el acetaldehído es reducido por el transportador de electrones biológico NADH:

$$\text{Acetaldehído} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{etanol} + \text{NAD}^+$$

A continuación calcule la variación de energía libre *real*, ΔG, cuando [acetaldehído] y [NADH] son 1,0 M y [etanol] y [NAD$^+$] son 0,100 M. Las semirreacciones pertinentes y sus valores de E'° son:

(1) $\text{Acetaldehído} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{etanol}$ $\quad E'^\circ = -0{,}197\ \text{V}$

(2) $\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$ $\quad E'^\circ = -0{,}320\ \text{V}$

Recuerde que, por convención, $\Delta E'^\circ$ se expresa como E'° para el aceptor de electrones menos E'° para el dador de electrones.

Solución: Ya que el acetaldehído está aceptando electrones ($n = 2$) del NADH, $\Delta E'^\circ = -0{,}197\ \text{V} - (-0{,}320\ \text{V}) = 0{,}123\ \text{V}$. Por tanto,

$$\Delta G'^\circ = -n\mathcal{F}\,\Delta E'^\circ = -2(96{,}5\ \text{kJ/V}\cdot\text{mol})(0{,}123\ \text{V}) = -23{,}7\ \text{kJ/mol}$$

Esta es la variación de energía libre para la reacción de oxidación-reducción a 25 °C y pH 7 cuando el acetaldehído, etanol, NAD$^+$ y NADH están presentes a concentración 1,00 M.

Si en cambio el acetaldehído y el NADH estuviesen presentes a concentración 1,00 M, pero el etanol y el NAD$^+$ a 0,100 M, el valor de ΔG se calcularía de la manera siguiente. Primero se determinan los valores de E para cada reductor (Ec. 13–5):

$$\begin{aligned} E_{\text{acetaldehído}} &= E^\circ + \frac{RT}{n\mathcal{F}}\ln\frac{[\text{acetaldehído}]}{[\text{etanol}]} \\ &= -0{,}197\ \text{V} + \frac{0{,}026\ \text{V}}{2}\ln\frac{1{,}00}{0{,}100} \\ &= -0{,}197\ \text{V} + 0{,}013\ \text{V}\,(2{,}303) = -0{,}167\ \text{V} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} E_{\text{NADH}} &= E^\circ + \frac{RT}{n\mathcal{F}}\ln\frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]} \\ &= -0{,}320\ \text{V} + \frac{0{,}026\ \text{V}}{2}\ln\frac{0{,}100}{1{,}00} \\ &= -0{,}320\ \text{V} + 0{,}013\ \text{V}(-2{,}303) = -0{,}350\ \text{V} \end{aligned}$$

A partir de aquí podemos calcular ΔE, y a continuación utilizamos la Ecuación 13–6 para calcular ΔG:

$$\begin{aligned} \Delta E &= -0{,}167\ \text{V} - (-0{,}350)\ \text{V} = 0{,}183\ \text{V} \\ \Delta G &= -n\mathcal{F}\,\Delta E \\ &= -2(96{,}5\ \text{kJ/V}\cdot\text{mol})(0{,}183\ \text{V}) \\ &= -35{,}3\ \text{kJ/mol} \end{aligned}$$

Ésta es la variación de energía libre real a las concentraciones especificadas de los pares redox.

La oxidación celular de glucosa a dióxido de carbono requiere transportadores de electrones especializados

Los principios de la energética de la oxidación-reducción antes descritos son aplicables a muchas reacciones metabólicas en las que intervienen transferencias de electrones. Por ejemplo, en muchos organismos la oxidación de glucosa suministra energía para la producción de ATP. La oxidación completa de la glucosa:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

tiene una $\Delta G'^\circ$ de –2.840 kJ/mol. Ésta es una liberación de energía libre muy superior a la necesaria para la síntesis de ATP en las células (50 a 60 kJ/mol; véase el Ejemplo práctico 13–2). Las células no convierten la glucosa en CO_2 en una sola reacción con gran liberación de energía, sino que lo hacen en una serie de reacciones controladas, algunas de las cuales son oxidaciones. La energía libre desprendida en estos pasos de oxidación es del mismo orden de magnitud que la requerida para la síntesis de ATP a partir de ADP, con algo de energía de sobra. Los electrones eliminados en estos pasos oxidativos se transfieren a coenzimas especializados en el transporte de electrones, tales como el NAD$^+$ y el FAD (descritos a continuación).

Unos cuantos tipos de coenzimas y proteínas actúan como transportadores universales de electrones

La multitud de enzimas que catalizan las oxidaciones celulares canalizan los electrones desde centenares de sustratos diferentes a sólo unos cuantos tipos de transportadores universales de electrones. La reducción de estos transportadores en los procesos catabólicos permite la conservación de la energía libre que se produce en la oxidación de los sustratos. El NAD$^+$, NADP$^+$, FMN y FAD son coenzimas hidrosolubles que experimentan oxidación y reducción reversibles en muchas de las reacciones de transferencia de electrones del metabolismo. Los nucleótidos NAD$^+$ y NADP$^+$ se trasladan fácilmente de un enzima a otro; los nucleótidos de flavina FMN y FAD están normalmente muy fuertemente unidos a los enzimas, denominados flavoproteínas, en los que actúan de grupo prostético. Las quinonas liposolubles tales como la ubiquinona y la plastoquinona actúan como transportadores de electrones y dadores de protones en el medio no acuoso de las membranas. Las proteínas ferro-sulfuradas y los citocromos, que tienen grupos prostéticos fuertemente unidos que experimentan oxidación-reducción reversibles, también actúan como transportadores de electrones en muchas reacciones de oxidación-reducción. Algunas de estas proteínas son hidrosolubles, pero otras son proteínas periféricas o integrales de membrana (véase la Fig. 11–6).

Concluiremos este capítulo describiendo algunas características químicas de los coenzimas nucleotídicos y de algunos de los enzimas (deshidrogenasas y flavoproteínas) que los utilizan. La química de oxidación-reducción de las quinonas, proteínas ferro-sulfuradas y citocromos se trata en el Capítulo 19.

El NADH y el NADPH actúan con las deshidrogenasas como transportadores solubles de electrones

El nicotinamida adenina dinucleótido (NAD; NAD$^+$ en su forma oxidada) y su análogo próximo, el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP; NADP$^+$ en su forma oxidada) están compuestos por dos nucleótidos unidos a través de sus grupos fosfato por un enlace fosfoanhídrido **(Fig. 13–24a)**. Debido a

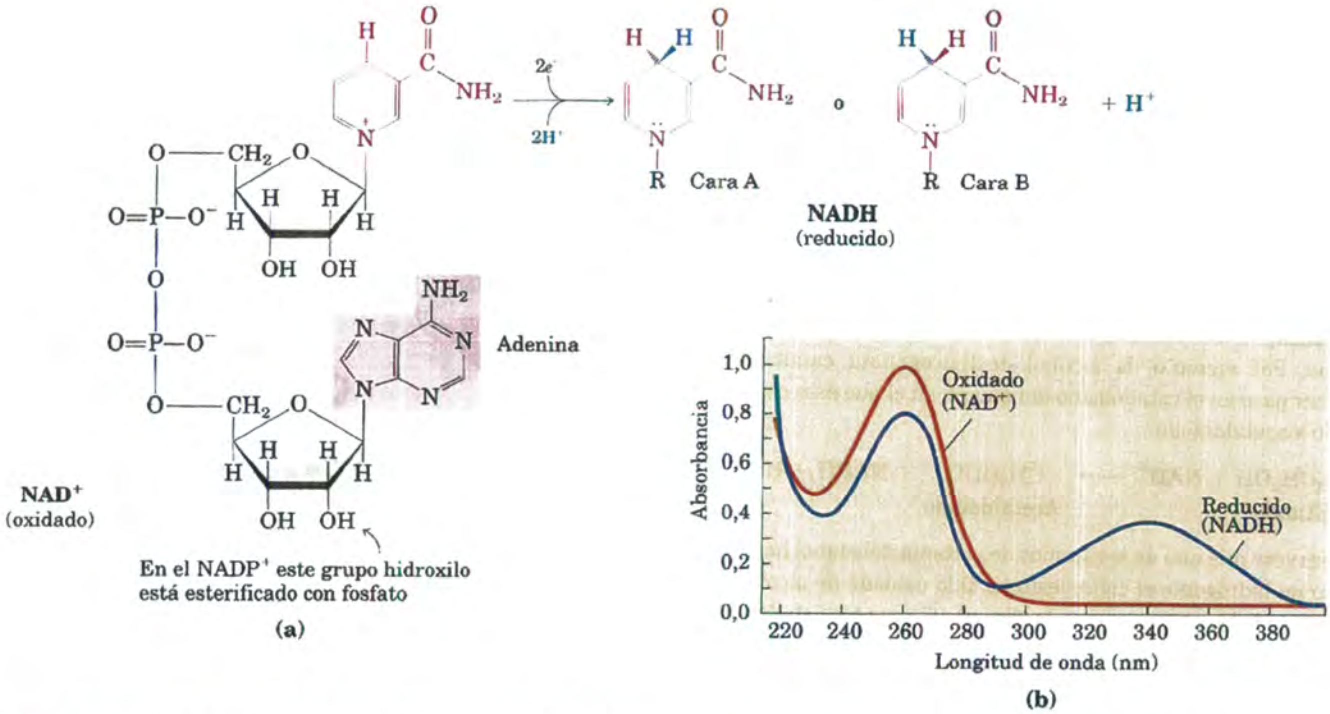


FIGURA 13–24 NAD y NADP. (a) El nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y su análogo fosforilado $NADP^+$ se reducen a NADH y NADPH, aceptando un ión hidruro (dos electrones y un protón) a partir de un sustrato oxidable. El ión hidruro se puede adicionar en la parte frontal (cara A) o posterior (cara B) del anillo plano de la nicotinamida (véase la Tabla 13-8). (b) Espectro de absorción UV del NAD^+ y del NADH. La reducción del anillo de nicotinamida produce una nueva banda de absorción ancha con un máximo a 340 nm. La producción de NADH durante una reacción catalizada enzimáticamente puede seguirse de forma conveniente observando la aparición de la absorbancia a 340 nm (el coeficiente de extinción molar $\varepsilon_{340} = 6.200\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

que el anillo de nicotinamida se parece a la piridina, a estos compuestos se los denomina a veces **nucleótidos de piridina.** La vitamina niacina (factor PP o preventivo de la pelagra) es la encargada de aportar la porción de nicotinamida de los nucleótidos de nicotinamida.

Ambos coenzimas experimentan reducción reversible del anillo de la nicotinamida (Fig. 13–24). Mientras una molécula de sustrato es oxidada (deshidrogenación), cediendo dos átomos de hidrógeno, la forma oxidada del nucleótido (NAD^+ o $NADP^+$) acepta un ión hidruro ($:H^-$, el equivalente de un protón y dos electrones) y se transforma en la forma reducida (NADH o NADPH). El segundo protón eliminado del sustrato se libera al disolvente acuoso. Las semirreacciones para estos cofactores nucleotídicos son

$$NAD^+ + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NADH + H^+$$
$$NADP^+ + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NADPH + H^+$$

La reducción de NAD^+ o $NADP^+$ convierte el anillo bencenoide de la porción nicotinamida (con una carga positiva fija sobre el nitrógeno del anillo) en la forma quinonoide (sin carga en el nitrógeno). Los nucleótidos reducidos absorben luz a 340 nm; las formas oxidadas no la absorben (Fig. 13–24b). Observe que el signo positivo de las abreviaturas NAD^+ y $NADP^+$ *no* indica la carga neta de estas moléculas (de hecho, ambas están cargadas negativamente); indican que el anillo de nicotinamida está en su forma oxidada, con una carga positiva sobre el átomo de nitrógeno. En las abreviaturas NADH y NADPH, la "H" indica el ión hidruro añadido. Para referirnos a estos nucleótidos sin especificar su estado de oxidación utilizaremos NAD y NADP.

La concentración total de NAD^+ + NADH en la mayoría de tejidos es alrededor de 10^{-5} M, y la de $NADP^+$ + NADPH es de alrededor de 10^{-6} M. En muchas células y tejidos, la proporción NAD^+ (oxidado) a NADH (reducido) es elevada, favoreciendo la transferencia de hidruro *hacia* el NAD^+ para formar NADH. Por el contrario, el NADPH está presente generalmente en concentración más elevada que su forma oxidada, $NADP^+$, lo que favorece la transferencia de hidruro *desde* el NADPH a un sustrato. Esto refleja los papeles metabólicos especializados de los dos coenzimas: el NAD^+ generalmente funciona en oxidaciones, normalmente como parte de una reacción catabólica, mientras que el NADPH es el coenzima habitual en las reducciones, casi siempre como parte de una reacción anabólica. Unos pocos enzimas pueden utilizar cualquiera de los dos coenzimas, pero la mayoría muestran un preferencia clara por uno sobre el otro. Los procesos en los que actúan estos dos cofactores también están segregados en las células eucarióticas: por ejemplo, las oxidaciones de combustibles tales como el piruvato, ácidos grasos y α-cetoácidos procedentes de aminoácidos tienen lugar en la matriz mitocondrial, mientras que los procesos de biosíntesis reductora tales como la síntesis de ácidos grasos tienen lugar en el citosol. Esta especialización funcional y espacial permite que una célula mantenga dos reservas ("pools") distintas de transportadores de electrones, con dos funciones también distintas.

Se conocen más de 200 enzimas que catalizan reacciones en las que el NAD^+ (o el $NADP^+$) aceptan un ión hidruro desde algún sustrato reducido, o en el que el NADPH (o el NADH) donan un ión hidruro a un sustrato oxidado. Las reacciones generales son

$$AH_2 + NAD^+ \longrightarrow A + NADH + H^+$$
$$A + NADPH + H^+ \longrightarrow AH_2 + NADP^+$$

en donde AH_2 es el sustrato reducido y A el sustrato oxidado. El nombre general para los enzimas de este tipo es **oxidorreductasa;** también se les denomina habitualmente deshidrogenasas. Por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa cataliza el primer paso en el catabolismo del etanol, en el que éste es oxidado a acetaldehído:

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3CH_2OH} + NAD^+ \longrightarrow \underset{\text{Acetaldehído}}{CH_3CHO} + NADH + H^+$$

Obsérvese que uno de los átomos de carbono del etanol ha perdido un hidrógeno; el compuesto ha sido oxidado de alcohol a aldehído (véase una vez más la Fig. 13–22 para los estados de oxidación del carbono).

Cuando se reduce el NAD^+ o el $NADP^+$, el ión hidruro podría, en principio, ser transferido a cualquiera de las dos caras del anillo de nicotinamida: la frontal (cara A) o la posterior (cara B) según se representa en la Figura 13–24a. Estudios realizados con sustratos marcados isotópicamente han demostrado que un enzima determinado cataliza una transferencia de tipo A o de tipo B, pero no las dos. Por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa de levadura y la lactato deshidrogenasa del corazón de vertebrados transfieren un ión hidruro a (o eliminan un ión hidruro de) la cara A del anillo de nicotinamida; se clasifican como deshidrogenasa tipo A para distinguirlas de otro grupo de enzimas que transfieren el ión hidruro a (o eliminan un ión hidruro de) la cara B del anillo de nicotinamida (Tabla 13–8).

La especificidad por una cara u otra puede ser espectacular; la lactato deshidrogenasa, por ejemplo, prefiere la cara A sobre la cara B con un factor de 5×10^7. La base de esta preferencia reside en la colocación exacta de los grupos del enzima que intervienen en la formación de enlaces de hidrógeno con el grupo $—CONH_2$ de la nicotinamida.

La mayoría de deshidrogenasas que utilizan NAD o NADP unen el cofactor en un dominio proteico conservado denominado pliegue de Rossman (de Michael Rossman, quien dedujo la estructura de la lactato deshidrogenasa y describió por primera vez este motivo estructural). El pliegue de Rossmann consta normalmente de una hoja β paralela de seis cadenas y cuatro hélices α asociadas (**Fig. 13–25**).

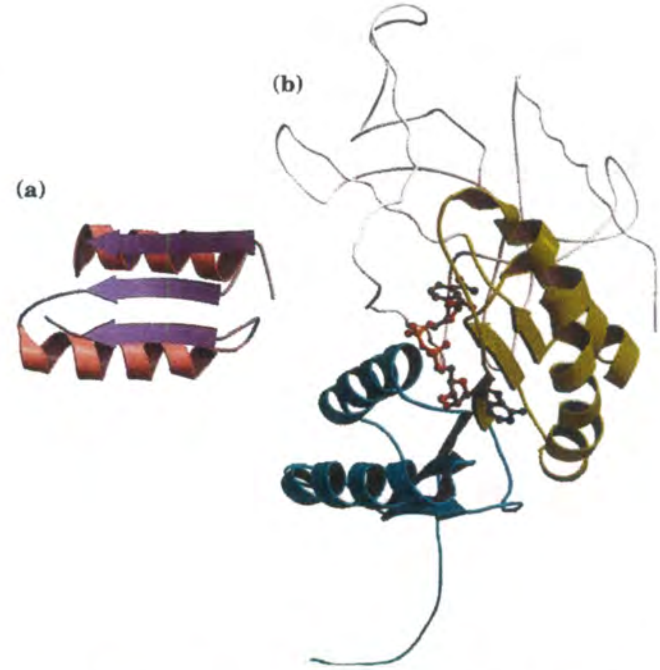


FIGURA 13–25 Pliegue de Rossman. Este motivo estructural se encuentra en el sitio de fijación de NAD de muchas deshidrogenasas. **(a)** Está formado por un par de motivos estructuralmente similares, cada uno con tres hojas β paralelas y dos hélices α (β-α-β-α-β). **(b)** Dominio de fijación de nucleótido del enzima lactato deshidrogenasa (obtenido de PDB ID 3LDH) con el NAD (estructura de bolas y varillas) unido en una conformación extendida a través de puentes de hidrógeno y enlaces salinos a los motivos apareados β-α-β-α-β del pliegue de Rossman (tonos verdosos)

La asociación entre una deshidrogenasa y el NAD o NADP es relativamente débil; el coenzima difunde fácilmente desde un enzima a otro, actuando como transportador de electrones hidrosoluble desde un metabolito a otro. Por ejemplo, en la producción de alcohol durante la fermentación de la

TABLA 13–8 Estereoespecificidad de las deshidrogenasas que emplean NAD^+ o $NADP^+$ como coenzimas

Enzima	Coenzima	Especificidad estereoquímica para el anillo de la nicotinamida (A o B)	Página(s) del texto
Isocitrato deshidrogenasa	NAD^+	A	624
α-Cetoglutarato deshidrogenasa	NAD^+	B	625
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	$NADP^+$	B	560
Malato deshidrogenasa	NAD^+	A	628
Glutamato deshidrogenasa	NAD^+ o $NADP^+$	B	680
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	NAD^+	B	535
Lactato deshidrogenasa	NAD^+	A	547
Alcohol deshidrogenasa	NAD^+	A	547

glucosa por las células de levadura, se elimina un ión hidruro del gliceraldehído 3-fosfato por un enzima (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, un enzima de tipo B) y se transfiere al NAD^+.

El NADH producido abandona la superficie del enzima y difunde a otro enzima (alcohol deshidrogenasa, un enzima de tipo A), el cual transfiere un ión hidruro al acetaldehído, produciendo etanol:

(1) **Gliceraldehído 3-fosfato + NAD^+ ⟶ 3-fosfoglicerato + NADH + H^+**

(2) **Acetaldehído + NADH + H^+ ⟶ etanol + NAD^+**

Suma: **Gliceraldehído 3-fosfato + acetaldehído ⟶ 3-fosfoglicerato + etanol**

Obsérvese que en la reacción global no hay producción o consumo neto de NAD^+ o NADH; los coenzimas funcionan catalíticamente y se reciclan de forma repetida sin cambio neto en la concentración de NAD^+ + NADH.

La carencia en la dieta de niacina, forma vitamínica del NAD y del NADP, produce pelagra

Tal como se observó en el Capítulo 6, y continuaremos discutiendo en los capítulos siguientes, la mayoría de coenzimas provienen de sustancias denominadas vitaminas. Los anillos tipo piridina del NAD y del NADP provienen de la vitamina **niacina** (ácido nicotínico; **Fig. 13–26**), que se sintetiza a partir del triptófano. El ser humano generalmente no puede sintetizar niacina en cantidad suficiente, en especial aquellos individuos que consumen dietas pobres en triptófano (el maíz, por ejemplo, tiene un bajo contenido en triptófano). La carencia de niacina, que afecta a todas las deshidrogenasas dependientes de NAD(P), es causa de la grave enfermedad humana llamada pelagra (del italiano "piel rugosa"), así somo de una enfermedad relacionada de los perros denominada lengua negra. Estas enfermedades se caracterizan por las "tres D": dermatitis, diarrea y demencia, seguidas en muchos casos por la muerte. Hace un siglo, la pelagra era una enfermedad común; por ejemplo, en el sur de Estados Unidos, en donde el maíz era un componente básico de la dieta, había unas 100.000 personas afectadas y alrededor de 10.000 murieron como resultado de esta enfermedad entre 1912 y 1916. En 1920 Joseph Goldberger demostró que la pelagra era debida a una insuficiencia en la dieta y en 1937 Frank Strong, D. Wayne Woolley y Conrad Elvehjem identificaron la niacina como agente curativo de la lengua negra.

Frank Strong, 1908–1993

D. Wayne Woolley, 1914–1966

Conrad Elvehjem, 1901–1962

La suplementación de la dieta humana con este económico compuesto condujo a la erradicación de la pelagra en las poblaciones del mundo desarrollado, con una excepción significativa. La pelagra todavía se encuentra con bastante frecuencia entre los alcohólicos o los que beben cantidades excesivas de alcohol. En estos individuos la absorción intestinal de niacina está muy reducida y sus necesidades calóricas están satisfechas, a menudo a base de licores destilados que carecen prácticamente de vitaminas, entre ellas la niacina. En unos pocos lugares, como en la Meseta del Deccan, en la India, la pelagra aún aparece, especialmente entre los pobres. ■

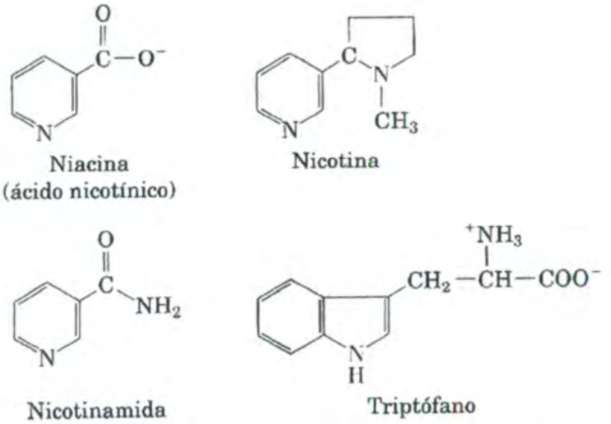


FIGURA 13–26 Estructuras de la niacina (ácido nicotínico) y su derivado nicotinamida. El precursor biosintético de estos compuestos es el triptófano. En el laboratorio el ácido nicotínico se obtuvo por primera vez por oxidación del producto natural nicotina (de ahí el nombre). Tanto el ácido nicotínico como la nicotinamida curan la pelagra, pero la nicotina (de los cigarrillos o de otro origen) no tiene actividad curativa.

Los nucleótidos de flavina están fuertemente unidos en las flavoproteínas

Las **flavoproteínas** (Tabla 13–9) son enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción utilizando flavina mononucleótido (FMN) o flavina adenina dinucleótido (FAD) como coenzima **(Fig. 13–27)**. Estos coenzimas, los **nucleótidos de flavina,** provienen de la vitamina riboflavina. La estructura de anillos fusionados de los nucleótidos de flavina (el anillo isoaloxazina) se reduce de manera reversible, aceptando uno o dos electrones en forma de uno o dos átomos de hidrógeno (cada átomo consiste en un electrón más un protón) desde un sustrato reducido. Las formas completamente reducidas se abrevian $FMNH_2$ y $FADH_2$. Cuando un nucleótido de flavina totalmente oxidado acepta solo un electrón (un átomo de hidrógeno), se produce la forma semiquinona del anillo de isoaloxazina, abreviada $FADH^{\bullet}$ y $FMNH^{\bullet}$. Debido a que los nucleótidos de flavina tienen una especialidad química algo diferente de la de los coenzimas de nicotinamida (la capacidad de participar tanto en

TABLA 13–9 Algunos enzimas (flavoproteínas) que utilizan coenzimas de nucleótidos de flavia

Enzima	Nucleótido de flavina	Página(s) del texto
Acil-CoA deshidrogenasa	FAD	653
Dihidrolipoil deshidrogenasa	FAD	619
Succinato deshidrogenasa	FAD	628
Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa	FAD	732
Tiorredoxina reductasa	FAD	888
NADH deshidrogenasa (Complejo I)	FMN	712–714
Glicolato deshidrogenasa	FMN	787

transferencias de uno como de dos electrones), las flavoproteínas intervienen en una mayor variedad de reacciones que las deshidrogenasas ligadas a NAD(P).

Al igual que los coenzimas de nicotinamida (Fig. 13–24), cuando se reducen los nucleótidos de flavina experimentan un desplazamiento de una banda de absorción principal que también es útil para los bioquímicos que desean seguir reacciones en las que intervienen estos coenzimas. Las flavoproteínas totalmente reducidas (dos electrones aceptados) tienen generalmente un máximo de absorción cerca de 360 nm. Cuando están parcialmente reducidas (un electrón) adquieren otro máximo de absorción alrededor de 450 nm; cuando están totalmente oxidadas, la flavina tiene un máximo entre 370 y 440 nm.

El nucleótido de flavina en la mayoría de flavoproteínas está unido fuertemente a la proteína, y en algunos enzimas, tales como la succinato deshidrogenasa, lo está de manera covalente. Estos coenzimas fuertemente unidos se denominan propiamente grupos prostéticos. No transfieren electrones difundiendo desde un enzima a otro; en lugar de ello, proporcionan un medio por el que la flavoproteína puede retener temporalmente electrones mientras cataliza la transferencia de electrones desde un sustrato reducido a un aceptor de electrones. Una característica importante de las flavoproteínas es la variabilidad en el potencial de reducción estándar ($E'°$) del nucleótido de flavina ligado. La fuerte asociación entre el enzima y el grupo prostético confiere al anillo de flavina un potencial de reducción típico de aquella flavoproteína en particular, que es a veces muy diferente del potencial de reducción del nucleótido de flavina libre. El FAD unido a la succinato deshidrogenasa, por ejemplo, posee un $E'°$ cercano a 0,0 V, en comparación con −0,219 V para el FAD libre. El $E'°$ para otras flavoproteínas va desde −0,40 V a +0,06 V. Las flavoproteínas son frecuentemente muy complejas; algunas tienen, además de un nucleótido de flavina, iones inorgánicos fuertemente unidos (hierro o molibdeno, por ejemplo) que pueden participar en transferencias de electrones.

Ciertas flavoproteínas actúan con un papel muy diferente como receptores de luz. Los **criptocromos** son una familia de flavoproteínas ampliamente distribuida entre las eucariotas que intervienen en los efectos de la luz azul sobre el desarrollo de las plantas y los efectos de la luz sobre los ritmos circadianos (oscilaciones en fisiología y bioquímica con un período de 24 horas) de los mamíferos. Son homólogos de otra familia de flavoproteínas denominadas fotoliasas. Presentes tanto en bacterias como en eucariotas, las **fotoliasas** utilizan la energía absorbida de la luz para reparar defectos del DNA.

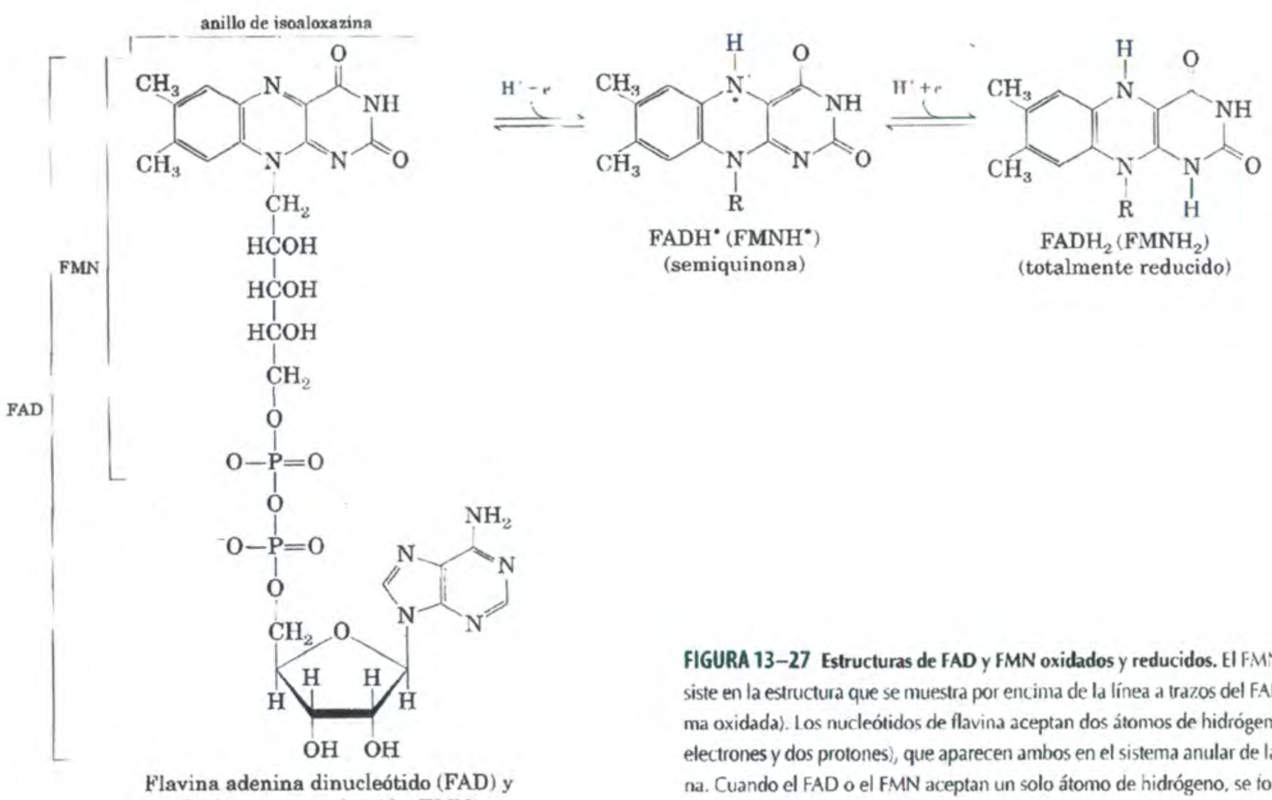


FIGURA 13–27 Estructuras de FAD y FMN oxidados y reducidos. El FMN consiste en la estructura que se muestra por encima de la línea a trazos del FAD (forma oxidada). Los nucleótidos de flavina aceptan dos átomos de hidrógeno (dos electrones y dos protones), que aparecen ambos en el sistema anular de la flavina. Cuando el FAD o el FMN aceptan un solo átomo de hidrógeno, se forma la semiquinona que es un radical libre estable.

La función de las flavoproteínas como transportadores de electrones la examinaremos en el Capítulo 19 en el que consideraremos sus papeles en la fosforilación oxidativa (en las mitocondrias) y en la fotofosforilación (en los cloroplastos); por su parte, describiremos las reacciones de las fotoliasas en el Capítulo 25.

RESUMEN 13.4 Reacciones de oxidación-reducción biológicas

- En muchos organismos un proceso central en la conservación de la energía es la oxidación por pasos de la glucosa a CO_2, proceso mediante el cual parte de la energía de oxidación se conserva en forma de ATP a medida que los electrones pasan al O_2.
- Las reacciones de oxidación-reducción biológicas se pueden describir en términos de dos semirreacciones, cada una de ellas con un potencial de reducción estándar característico, E'°.
- Cuando se conectan dos semiceldas electroquímicas, cada una con los componentes de una semirreacción, los electrones tienen una tendencia a fluir desde la semicelda con el potencial de reducción más elevado. La fuerza de esta tendencia es proporcional a la diferencia entre los dos potenciales de reducción (ΔE) y es función de la concentración de las especies oxidadas y reducidas.
- La variación de energía libre estándar de una reacción de oxidación-reducción es directamente proporcional a la diferencia en los potenciales de reducción estándar de las dos semiceldas: $\Delta G'^{\circ} = -n\mathcal{F}\,\Delta E'^{\circ}$.
- Muchas reacciones de oxidación biológicas son deshidrogenaciones en las que se transfieren uno o dos átomos de hidrógeno ($H^+ + e^-$) desde un sustrato a un aceptor de hidrógeno. En las reacciones de oxidación-reducción en las células vivas intervienen transportadores de electrones especializados.
- El NAD y el NADP son los coenzimas de difusión libre de muchas deshidrogenasas. Tanto el NAD^+ como el $NADP^+$ aceptan dos electrones y un protón.
- El FAD y el FMN, los nucleótidos de flavina, son los grupos prostéticos fuertemente unidos de las flavoproteínas. Pueden aceptar tanto uno como dos electrones y uno o dos protones. Las flavoproteínas también sirven como receptores de luz en los criptocromos y en las fotoliasas.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

autótrofo 485
heterótrofo 485
metabolismo 486
rutas metabólicas 486
metabolito 486
metabolismo intermediario 486
catabolismo 486
anabolismo 486
constantes estándar transformadas 491
rotura homolítica 496
radical 496
rotura heterolítica 496
nucleófilo 496
electrófilo 496
carbanión 496
carbocatión 496
condensación aldólica 497
condensación de Claisen 497
quinasa 500
potencial de fosforilación (ΔG_p) 502
tioéster 505
adenililación 508
pirofosfato inorgánico hidrolasa 508
nucleósido difosfato quinasa 510
adenilato quinasa 510
creatina quinasa 510
fosfágenos 511
polifosfato quinasa-1, quinasa-2 511
fuerza electromotriz (fem) 512
par redox conjugado 512
deshidrogenación 513
deshidrogenasas 513
equivalente de reducción 514
potencial de reducción estándar (E'°) 514
nucleótido de piridina 517
oxidorreductasa 518
flavoproteína 519
nucleótidos de flavina 519
criptocromo 520
fotoliasa 520

Bibliografía

Bioenergética y termodinámica

Atkins, P.W. (1984) *The Second Law*, Scientific American Books, Inc., New York.

Discusión bien ilustrada y elemental de la segunda ley y sus implicaciones.

Atkinson, D.E. (1977) *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*, Academic Press, Inc., New York.

Tratamiento clásico de los papeles del ATP, ADP y AMP en el control de la velocidad del catabolismo.

Bergethon, P.R. (1998) *The Physical Basis of Biochemistry*, Springer Verlag, New York.

Los capítulos 11 a 13 de este libro, y los libros de Tinoco et al. y van Holde et al. (más adelante), son excelentes referencias generales para la bioquímica física, con buenas discusiones de las aplicaciones de la termodinámica a la bioquímica.

Edsall, J.T. & Gutfreund, H. (1983) *Biothermodynamics: The Study of Biochemical Processes at Equilibrium*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Hammes, G. (2000) *Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Escrito con claridad, bien ilustrado, con excelentes ejemplos y problemas.

Harold, F.M. (1986) *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*, W. H. Freeman and Company, New York.

Una magnífica y clara discusión sobre la termodinámica en los procesos biológicos.

Harris, D.A. (1995) *Bioenergetics at a Glance*, Blackwell Science, Oxford.

Un resumen breve, escrito con claridad, de la energética celular, que incluye capítulos de introducción a la termodinámica.

Haynie, D.T. (2001) *Biological Thermodynamics*, Cambridge University Press, Cambridge.

Discusiones muy accesibles sobre la termodinámica y la cinética en sistemas biológicos.

Loewenstein, W.R. (1999) *The Touchstone of Life: Molecular Information, Cell Communication, and the Foundations of Life*, Oxford University Press, New York.

Discusión escrita espléndidamente sobre la relación entre entropía e información.

Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J. (2002) *Bioenergetics 3*, Academic Press, Inc., New York.

Discusión clara y bien ilustrada a nivel intermedio de la teoría de la bioenergética y de los mecanismos de transducción de energía.

Tinoco, I., Jr., Sauer, K., Wang, J.C., & Puglisi, J.D. (2002) *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences*, 4th edn, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.

Los Capítulos 2 a 5 cubren la termodinámica.

van Holde, K.E., Johnson, C., & Ho, P.S. (2006) *Principles of Physical Biochemistry*, 2nd edn, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.

Los Capítulos 2 y 3 son especialmente pertinentes.

Lógica química y reacciones bioquímicas comunes

Frey, P.A. (2001) Radical mechanisms of enzymatic catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 121–148.

Revisión muy útil de las reacciones que transcurren con mecanismos de radicales libres.

Frey, P.A. & Hegeman, A.D. (2006) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.

Fuente autorizada y puesta al día sobre las reacciones que se dan en los sistemas vivientes.

Gutteridge, A. & Thornton, J.M. (2005) Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 622–629.

Kraut, D.A., Carroll, K.S., & Herschlag, D. (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 517–571.

Buen resumen de los principios de la catálisis enzimática tal como se comprende actualmente y lo que aún no se conoce.

Transferencia de grupos fosfato y ATP

Alberty, R.A. (1994) Biochemical thermodynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 1–11.

Explica la distinción entre ecuaciones químicas y bioquímicas, y los cálculos y significado de las propiedades termodinámicas transformadas para el ATP y otros compuestos fosforilados.

Bridger, W.A. & Henderson, J.F. (1983) *Cell ATP*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Química del ATP, su papel en la regulación metabólica y sus papeles catabólico y anabólico.

Brown, M.R.W. & Kornberg, A. (2004) Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16,085–16,087.

Fraley, C.D., Rashid, M.H., Lee, S.S.K., Gottschalk, R., Harrison, J., Wood, P.J., Brown, M.R.W., & Kornberg, A. (2007) A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 3526–3531.

Frey, P.A. & Arabshahi, A. (1995) Standard free-energy change for the hydrolysis of the α–β-phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* **34**, 11,307–11,310.

Hanson, R.W. (1989) The role of ATP in metabolism. *Biochem. Educ.* **17**, 86–92.

Excelente resumen de la química y biología del ATP.

Kalckar, H.M. (1991) Fifty years of biological research: from oxidative phosphorylation to energy requiring transport regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 1–37.

Discusión a nivel intermedio de la historia de los estudios sobre el ATP, en el que el autor jugó un papel importante.

Kornberg, A. (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 89–125.

Lipmann, F. (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv. Enzymol.* **11**, 99–162.

Descripción clásica del papel de los compuestos fosfato de alta energía en biología.

Pullman, B. & Pullman, A. (1960) Electronic structure of energy-rich phosphates. *Radiat. Res.*, Suppl. 2, 160–181.

Discusión avanzada de la química del ATP y de otros compuestos "ricos en energía".

Rees, D.C. & Howard, J.B. (1999) Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. *J. Mol. Biol.* **293**, 343–350.

Discusión de la base estructural para el acoplamiento eficiente de dos procesos energéticos mediante cambios en los estados conformacionales.

Veech, R.L., Lawson, J.W.R., Cornell, N.W., & Krebs, H.A. (1979) Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.* **254**, 6538–6547.

Determinación experimental de las concentraciones de ATP, ADP, y P_i en cerebro, músculo e hígado, y una discusión de las dificultades en la determinación de la variación de energía libre real para la síntesis del ATP en las células.

Westheimer, F.H. (1987) Why nature chose phosphates. *Science* **235**, 1173–1178.

Descripción por un químico de la aptitud única de los ésteres y anhídridos fosfato para las transformaciones metabólicas.

Reacciones de oxidación-reducción biológicas

Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., & Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760–765.

Dolphin, D., Avramovic, O., & Poulson, R. (eds). (1987) *Pyridine Nucleotide Coenzymes: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Excelente colección en dos volúmenes de revisiones por expertos. Entre las más útiles se encuentran los capítulos de Kaplan, Westheimer, Veech y Ohno y Ushio.

Fraaije, M.W. & Mattevi, A. (2000) Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 126–132.

Hosler, J.P., Ferguson-Miller, S., & Mills, D.S. (2006) Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 165–187.

Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 22,459–22,462.

Revisión breve de la química de la interacciones flavina-oxígeno en las flavoproteínas.

Rees, D.C. (2002) Great metalloclusters in enzymology. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 221–246.

Revisión avanzada sobre los tipos de agrupamientos de iones metálicos encontrados en los enzimas y sus modos de acción.

Roehm, K.-H. (2001) Electron carriers: proteins and cofactors in oxidative phosphorylation. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Inc./Wiley InterScience, www.els.net.

Buena visión general de las diferentes clases de transportadores de electrones que participan en la respiración.

Williams, R.E. & Bruce, N.C. (2002) New uses for an old enzyme—the old yellow enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology* **148**, 1607–1614.

Problemas

1. Cambios de entropía durante el desarrollo del huevo Consideremos un sistema que consiste en un huevo introducido en una incubadora. La clara y la yema del huevo contienen proteínas, glúcidos y lípidos. Si el huevo se fertiliza, se produce la transformación desde una sola célula en un organismo complejo. Discuta este proceso irreversible en términos de cambios de entropía en el sistema, el ambiente circundante y el universo. Asegúrese de que en primer lugar define claramente el sistema y su entorno.

2. Cálculo de $\Delta G'^\circ$ a partir de constantes de equilibrio Calcule la variación de energía libre estándar de las siguientes reacciones metabólicamente importantes, catalizadas por enzimas, a 25 °C y pH 7,0 a partir de las constantes de equilibrio dadas.

(a) Glutamato + oxalacetato $\xrightleftharpoons[\text{aminotransferasa}]{\text{aspartato}}$ aspartato + α-cetoglutarato $\quad K'_{eq} = 6{,}8$

(b) Dihidroxiacetona fosfato $\xrightleftharpoons[\text{isomerasa}]{\text{triosa fosfato}}$ gliceraldehído 3-fosfato $\quad K'_{eq} = 0{,}0475$

(c) Fructosa 6-fosfato + ATP $\xrightleftharpoons{\text{fosfofructoquinasa}}$ fructosa 1,6-bisfosfato + ADP $\quad K'_{eq} = 254$

3. Cálculo de la constante de equilibrio a partir de $\Delta G'^{\circ}$ Calcule las constantes de equilibrio K'_{eq} para cada una de las siguientes reacciones a pH 7,0 y 25 °C, utilizando los valores de $\Delta G'^{\circ}$ de la Tabla 13–4:

(a) Glucosa 6-fosfato + H_2O $\xrightleftharpoons[\text{6-fosfatasa}]{\text{glucosa}}$ glucosa + P_i

(b) Lactosa + H_2O $\xrightleftharpoons{\beta\text{-galactosidasa}}$ glucosa + galactosa

(c) Malato $\xrightleftharpoons{\text{fumarasa}}$ fumarato + H_2O

4. Determinación experimental de K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$ Si se incuba un disolución 0,1 M de glucosa 1-fosfato a 25 °C con una cantidad catalítica de fosfoglucomutasa, la glucosa 1-fosfato se transforma en glucosa 6-fosfato. En el equilibrio, las concentraciones de los componentes de la reacción son

$$\text{Glucosa 1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato}$$
$$4{,}5 \times 10^{-3}\,\text{M} \qquad\qquad 9{,}6 \times 10^{-2}\,\text{M}$$

Calcule K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$ para esta reacción.

5. Determinación experimental de $\Delta G'^{\circ}$ para la hidrólisis del ATP La medición directa de la variación de energía libre estándar asociada a la hidrólisis del ATP es técnicamente bastante complicada, puesto que la pequeña cantidad de ATP que resta en el equilibrio es muy difícil de medir con absoluta precisión. No obstante, se puede calcular indirectamente el valor de $\Delta G'^{\circ}$ a partir de las constantes de equilibrio de otras dos reacciones enzimáticas que tienen constantes de equilibrio menos favorables:

$$\text{Glucosa 6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{glucosa} + P_i \qquad K'_{eq} = 270$$

$$\text{ATP} + \text{glucosa} \longrightarrow \text{ADP} + \text{glucosa 6-fosfato} \qquad K'_{eq} = 890$$

Utilizando esta información sobre las constantes de equilibrio determinadas a 25 °C, calcule la energía libre estándar de hidrólisis del ATP.

6. Diferencia entre $\Delta G'^{\circ}$ y ΔG° Considere la interconversión siguiente, que tiene lugar en la glucólisis (Capítulo 14):

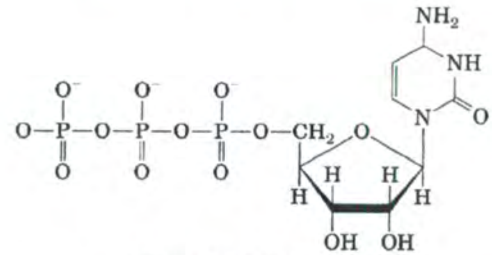
$$\text{Fructosa 6-fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato} \qquad K'_{eq} = 1{,}97$$

(a) ¿Cuál es el $\Delta G'^{\circ}$ para la reacción (a 25 °C)?

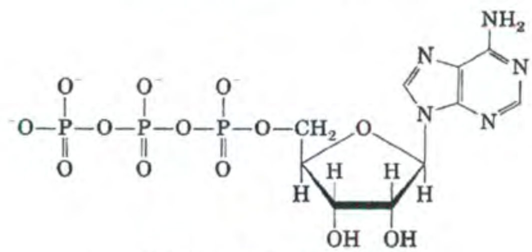
(b) Si se ajusta la concentración de fructosa 6-fosfato a 1,5 M y la de la glucosa 6-fosfato se ajusta a 0,50 M, ¿cuál es el valor de ΔG?

(c) ¿Por qué $\Delta G'^{\circ}$ y ΔG° son diferentes?

7. Energía libre de hidrólisis del CTP Compare la estructura del nucleósido trifosfato CTP con la estructura del ATP.



Citidina trifosfato (CTP)



Adenosina trifosfato (ATP)

Ahora prediga la K'_{eq} y la $\Delta G'^{\circ}$ de la siguiente reacción:

$$\text{ATP} + \text{CDP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{CTP}$$

8. Dependencia de ΔG respecto al pH La energía libre desprendida en la hidrólisis del ATP en condiciones estándar es −30,5 kJ/mol. Si el ATP se hidroliza en condiciones estándar excepto que el pH es 5,0 ¿se desprende más o menos energía libre? Explíquelo. Utilice el Gráfico Interactivo para explorar esta relación.

9. $\Delta G'^{\circ}$ de reacciones acopladas La glucosa 1-fosfato se convierte en fructosa 6-fosfato en dos reacciones sucesivas:

$$\text{Glucosa 1-fosfato} \longrightarrow \text{glucosa 6-fosfato}$$
$$\text{Glucosa 6-fosfato} \longrightarrow \text{fructosa 6-fosfato}$$

Utilizando los valores de $\Delta G'^{\circ}$ de la Tabla 13–4, calcule la constante de equilibrio, K'_{eq}, de la suma de las dos reacciones:

$$\text{Glucosa 1-fosfato} \longrightarrow \text{fructosa 6-fosfato}$$

10. Efecto de la razón [ATP]/[ADP] sobre la energía libre de hidrólisis del ATP Utilizando la Ecuación 13–4, represente ΔG frente ln Q (cociente de acción de masas) a 25 °C para las concentraciones de ATP, ADP y P_i de la tabla siguiente. $\Delta G'^{\circ}$ para la reacción es –30,5 kJ/mol. Utilice la gráfica resultante para explicar por qué está regulado el metabolismo para que mantenga una razón [ATP]/[ADP] elevada.

	Concentración (mM)				
ATP	5	3	1	0,2	5
ADP	0,2	2,2	4,2	5,0	25
P_i	10	12,1	14,1	14,9	10

11. Estrategia para superar una reacción desfavorable: acoplamiento químico dependiente del ATP La fosforilación de la glucosa a glucosa 6-fosfato es el paso inicial en el catabolismo de la glucosa. La fosforilación directa de la glucosa por el P_i se describe mediante la ecuación

Glucosa + P_i ⟶ glucosa 6-fosfato + H_2O

$$\Delta G'^{\circ} = 13{,}8 \text{ kJ/mol}$$

(a) Calcule la constante de equilibrio de la reacción anterior a 37 °C. En el hepatocito de rata las concentraciones fisiológicas de glucosa y P_i se mantienen a aproximadamente 4,8 mM. ¿Cuál es la concentración de equilibrio de la glucosa 6-fosfato obtenida por la fosforilación directa de la glucosa por el P_i? ¿Representa esta reacción una vía metabólica razonable para el catabolismo de la glucosa? Explíquelo.

(b) En principio, al menos, una forma de aumentar la concentración de glucosa 6-fosfato es impulsar la reacción de equilibrio hacia la derecha mediante el aumento de las concentraciones intracelulares de glucosa y P_i. Suponiendo una concentración fija de P_i de 4,8 mM, ¿qué valor habría de alcanzar la concentración intracelular de glucosa para tener una concentración de equilibrio de glucosa 6-fosfato de 250 μM (concentración fisiológica normal)? ¿Sería esta ruta fisiológicamente razonable puesto que la solubilidad máxima de la glucosa es inferior a 1M?

(c) La fosforilación de la glucosa en la célula está acoplada a la hidrólisis del ATP; esto es, parte de la energía libre de hidrólisis del ATP se utiliza para fosforilar la glucosa:

(1) Glucosa + P_i ⟶ glucosa 6-fosfato + H_2O $\quad \Delta G'^{\circ}$= 13,8 kJ/mol

(2) ATP + H_2O ⟶ ADP + P_i $\quad \Delta G'^{\circ}$= −30,5 kJ/mol

Suma: Glucosa + ATP ⟶ glucosa 6-fosfato + ADP

K'_{eq} a 37 °C de la reacción global. Cuando se lleva a cabo la fosforilación de la glucosa dependiente de ATP, ¿qué concentración de glucosa es necesaria para conseguir una concentración intracelular 250 μM de glucosa 6-fosfato cuando las concentraciones de ATP y ADP son 3,38 mM y 1,32 mM, respectivamente? ¿Proporciona este proceso de acoplamiento una ruta factible, al menos en principio, para la fosforilación de la glucosa en la célula? Explíquelo.

(d) Aunque el acoplamiento de la hidrólisis del ATP a la fosforilación de la glucosa tiene sentido termodinámicamente, no se ha especificado de qué forma tiene lugar dicho acoplamiento. Dado que el acoplamiento precisa de un intermedio común, una ruta posible sería utilizar la hidrólisis del ATP para aumentar la concentración intracelular de P_i e impulsar así la fosforilación desfavorable de la glucosa por el P_i. ¿Sería esto una ruta razonable? (Piense en los productos de solubilidad de los intermedios metabólicos.)

(e) La fosforilación de la glucosa acoplada al ATP es una reacción catalizada en los hepatocitos por el enzima glucoquinasa. Este enzima une ATP y glucosa formando un complejo glucosa-ATP-enzima, y el grupo fosforilo se transfiere directamente desde el ATP hasta la glucosa. Explique las ventajas que presenta esta ruta.

12. Cálculo de $\Delta G'^{\circ}$ de reacciones acopladas al ATP A partir de los datos de la Tabla 13–6 calcule el valor de $\Delta G'^{\circ}$ de las reacciones siguientes.

(a) Fosfocreatina + ADP ⟶ creatina + ATP
(b) ATP + fructosa ⟶ ADP + fructosa 6-fosfato

13. Acoplamiento de la rotura del ATP a una reacción desfavorable Para explorar las consecuencias de acoplar la hidrólisis del ATP en condiciones fisiológicas a una reacción bioquímica termodinámicamente desfavorable, considere la transformación hipotética X → Y, para la que $\Delta G'^{\circ}$ = 20,0 kJ/mol.

(a) ¿Cuál es la proporción [Y]/[X] cuando ambas sustancias se encuentran en equilibrio?

(b) Supongamos que X e Y participan en una secuencia de reacciones durante las que el ATP se hidroliza a ADP y P_i. La reacción global es

$$X + ATP + H_2O \longrightarrow Y + ADP + P_i$$

Calcule [Y]/[X] de esta reacción en el equilibrio. Suponga que la temperatura es 25 °C y las concentraciones de ATP, ADP y P_i son 1 M cuando la reacción está en el equilibrio.

(c) Sabemos que [ATP], [ADP] y [P_i] *no* son 1 M en condiciones fisiológicas. Calcule [Y]/[X] para la reacción acoplada al ATP cuando los valores de [ATP], [ADP] y [P_i] son los que se encuentran en los miocitos de rata (Tabla 13–5).

14. Cálculo de ΔG a concentraciones fisiológicas Calcule la ΔG real, fisiológica de la reacción

$$\text{Fosfocreatina} + \text{ADP} \longrightarrow \text{creatina} + \text{ATP}$$

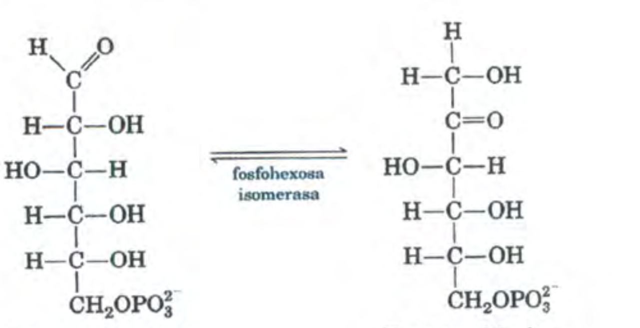
a 37 °C tal como se da en el citosol de las neuronas, en el que la fosfocreatina está presente a concentración 4,7 mM, la creatina a 1,0 mM, el ADP a 0,73 mM y el ATP a 2,6 mM.

15. Energía libre necesaria para la síntesis de ATP en condiciones fisiológicas En el citosol de los hepatocitos de rata, la temperatura es 37 °C y el cociente de acción de masas, Q, es

$$\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}_i]} = 5{,}33 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$$

Calcule la energía libre requerida para sintetizar ATP en el hepatocito de rata.

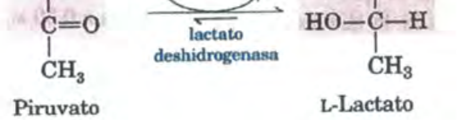
16. Lógica química En la ruta glucolítica, se rompe un azúcar de seis carbonos (fructosa 1,6-bisfosfato) formando dos azúcares de tres carbonos, que son metabolizados a continuación (véase la Fig. 14–5). En esta ruta tiene lugar una isomerización de la glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato (mostrada a continuación) dos pasos antes de la reacción de rotura (la etapa interpuesta es la fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato (p. 532).



Glucosa 6-fosfato — Fructosa 6-fosfato

¿Qué consigue el paso de isomerización desde la perspectiva química? (Pista: Considere qué podría suceder si la rotura del enlace C—C tuviese lugar sin la isomerización precedente.)

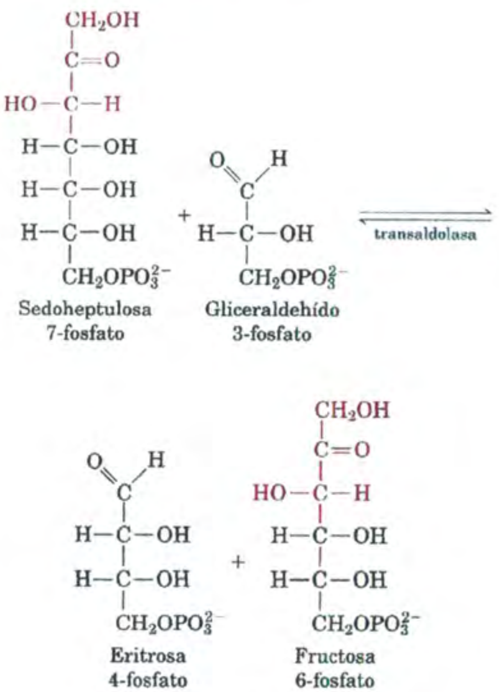
17. Mecanismos de reacción enzimáticos I La lactato deshidrogenasa es uno de los múltiples enzimas que requieren NADH como coenzima. Cataliza la conversión del piruvato en lactato:



Piruvato — L-Lactato

Dibuje el mecanismo de esta reacción (muestre las flechas de desplazamiento de electrones). (Pista: Esta es una reacción común a lo largo de todo el metabolismo; el mecanismo es similar al catalizado por otras deshidrogenasas que utilizan NADH, como por ejemplo la alcohol deshidrogenasa.)

18. Mecanismos de reacción enzimáticos II Las reacciones bioquímicas a menudo parecen más complejas de lo que lo son en realidad. En la vía de las pentosas fosfato (Capítulo 14), la sedoheptulosa 7-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato reaccionan formando eritrosa 4-fosfato y fructosa 6-fosfato en una reacción catalizada por la transaldolasa.



Escriba un mecanismo para esta reacción (muestre las flechas de desplazamiento de electrones). (Pista: Vuelva a echar un vistazo a las condensaciones aldólicas y, a continuación, considere el nombre del enzima.)

19. Utilización diaria de ATP por parte de los seres humanos adultos

(a) Se necesita un total de 30,5 kJ/mol de energía libre para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i cuando reactivos y productos se encuentran a concentración 1 M y la temperatura es 25 °C (estado estándar). Debido a que las concentraciones fisiológicas reales de ATP, ADP y P_i no son 1 M y la temperatura es 37 °C, la energía libre requerida para sintetizar ATP en condiciones fisiológicas es diferente de $\Delta G'^{\circ}$. Calcule la energía libre requerida para sintetizar ATP en el hepatocito humano cuando las concentraciones fisiológicas de ATP, ADP y P_i son 3,5, 1,50 y 5,0 mM, respectivamente.

(b) Un adulto de 68 kg requiere una ingesta calórica de 2.000 kcal (8.360 kJ) de alimento por día (24 horas). Este alimento es metabolizado y se utiliza la energía libre para sintetizar ATP, el cual proporciona seguidamente energía para realizar el trabajo químico y mecánico diario del cuerpo. Suponiendo que la eficiencia de conversión de la energía del alimento en ATP sea del 50%, calcule el peso de ATP utilizado por un ser humano adulto en un período de 24 horas. ¿Qué porcentaje representa respecto al peso corporal?

(c) Aunque los adultos sintetizan diariamente grandes cantidades de ATP, su peso corporal, estructura y composición no cambian significativamente durante este período. Explique esta aparente contradicción.

20. Velocidades de recambio de los fosfatos γ y β del ATP Si se añade a un extracto de levadura una pequeña cantidad de ATP marcado con fósforo radiactivo en la posición terminal, [γ-^{32}P]ATP, alrededor de la mitad de la actividad ^{32}P se encuentra en el P_i al cabo de unos pocos minutos, aunque la concentración de ATP permanece inalterada. Explíquelo. Si se realiza el mismo experimento utilizando ATP marcado con ^{32}P en la posición central, [β-^{32}P]ATP, el ^{32}P no aparece en el P_i en un tiempo tan corto. ¿Por qué?

21. Escisión del ATP a AMP y PP_i durante el metabolismo La síntesis de la forma activada del acetato (acetil-CoA) se realiza en un proceso dependiente de ATP:

$$\text{Acetato} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acetil-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

(a) La $\Delta G'^{\circ}$ para la hidrólisis del acetil-CoA a acetato y CoA es −32,2 kJ/mol y para la hidrólisis del ATP a AMP y PP_i es −30,5 kJ/mol. Calcule $\Delta G'^{\circ}$ para la síntesis de acetil-CoA dependiente de ATP.

(b) Casi todas las células contienen el enzima pirofosfato inorgánico hidrolasa que cataliza la hidrólisis de PP_i a P_i. ¿Qué efecto tiene la presencia de este enzima sobre la síntesis de acetil-CoA? Explíquelo.

22. Energía para el bombeo de H^+ Las células parietales de la pared del estómago contienen "bombas" de membrana que transportan iones hidrógeno desde el citosol (pH 7,0) al estómago, contribuyendo a la acidez del jugo gástrico (pH 1,0). Calcule la energía libre requerida para transportar 1 mol de iones hidrógeno a través de estas bombas (Sugerencia: Véase el Capítulo 11.) Suponga una temperatura de 37 °C.

23. Potenciales de reducción estándar El potencial de reducción estándar, E'°, de cualquier par redox viene definido por la reacción de semicelda:

$$\text{Agente oxidante} + n \text{ electrones} \longrightarrow \text{agente reductor}$$

Los valores de E'° para los pares redox conjugados NAD^+/NADH y piruvato/lactato son −0,32 V y −0,19 V, respectivamente.

(a) ¿Cuál de los dos pares conjugados tiene mayor tendencia a perder electrones? Explíquelo.

(b) ¿Cuál es el agente oxidante más fuerte? Explíquelo.

(c) Si empezamos con concentraciones 1 M de cada reactivo y producto a pH 7 y 25 °C, ¿en qué dirección transcurrirá la siguiente reacción?

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{lactato} + \text{NAD}^+$$

(d) ¿Cuál es el cambio de energía libre estándar ($\Delta G'^{\circ}$) para la conversión de piruvato en lactato?

(e) ¿Cuál es la constante de equilibrio (K'_{eq}) de esta reacción?

24. Extensión energética de la cadena respiratoria La transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial se puede representar mediante la siguiente ecuación de reacción neta

$$\text{NADH} + \text{H}^+ + \tfrac{1}{2}\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$$

(a) Calcule el valor de $\Delta E'^{\circ}$ de la reacción neta de la transferencia electrónica mitocondrial. Utilice los valores de E'° de la Tabla 13–7.

(b) Calcule $\Delta G'^{\circ}$ de esta reacción.

(c) ¿Cuántas moléculas de ATP se pueden generar *teóricamente* por esta reacción si la energía libre de síntesis de ATP en condiciones celulares es 52 kJ/mol?

25. Dependencia de la fuerza electromotriz respecto a las concentraciones Calcule la fuerza electromotriz (en voltios) registrada por un electrodo inmerso en una solución que contiene las siguientes mezclas de NAD^+ y NADH a pH 7,0 y 25 °C, con referencia a una semicelda de $E'° = 0{,}00$ V.

(a) NAD^+ 1,0 mM y NADH 10 mM
(b) NAD^+ 1,0 mM y NADH 1,0 mM
(c) NAD^+ 10 mM y NADH 1,0 mM

26. Afinidad electrónica de los compuestos Ponga las siguientes sustancias en orden de tendencia creciente para aceptar electrones: (a) α-cetoglutarato + CO_2 (produciendo isocitrato), (b) oxalacetato, (c) O_2, (d) $NADP^+$.

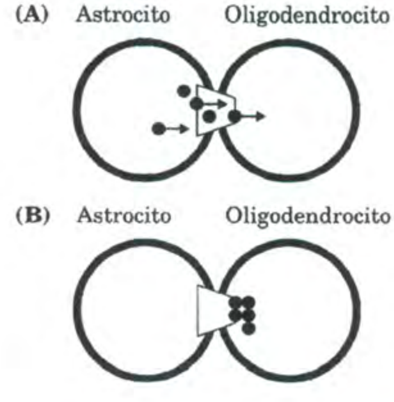
27. Dirección de las reacciones de oxidación-reducción ¿Cuál de las siguientes reacciones podría esperarse que transcurriese en la dirección mostrada, en condiciones estándar, suponiendo que están presentes los enzimas apropiados para catalizarlas?

(a) Malato + NAD^+ $\longrightarrow$ oxalacetato + NADH + H^+
(b) Acetoacetato + NADH + H^+ $\longrightarrow$ β-hidroxibutirato + NAD^+
(c) Piruvato + NADH + H^+ $\longrightarrow$ lactato + NAD^+
(d) Piruvato + β-hidroxibutirato $\longrightarrow$ lactato + acetoacetato
(e) Malato + piruvato $\longrightarrow$ oxalacetato + lactato
(f) Acetaldehído + succinato $\longrightarrow$ etanol + fumarato

Problema de análisis de datos

28. La termodinámica puede ser complicada La termodinámica puede ser un área de estudio complicada y con muchas oportunidades para la confusión. Un ejemplo interesante puede encontrarse en un artículo de Robinson, Hampson, Munro y Vaney, publicado en *Science* en 1993. Robinson y colaboradores estudiaron el desplazamiento de moléculas pequeñas entre células vecinas del sistema nervioso a través de canales intercelulares (uniones en hendidura). Encontraron que los colorantes amarillo Lucifer (una molécula pequeña cargada negativamente) y la biocitina (una molécula pequeña zwitteriónica) se desplazaban en una única dirección entre dos tipos de glia (células no neuronales del sistema nervioso). El colorante inyectado en los astrocitos pasa rápidamente a astrocitos adyacentes, oligodendrocitos o células de Müller, pero el colorante inyectado en los oligodendrocitos o células de Müller pasó lentamente, si es que lo hacía, a los astrocitos. Todos estos tipos de células estaban conectadas por uniones en hendidura.

Aunque no era un punto central del artículo, los autores presentaron un modelo molecular sobre cómo podría tener lugar este transporte unidireccional, como se muestra en su Figura 3:



El pie de figura dice: "Modelo de la difusión unidireccional del colorante entre oligodendrocitos y astrocitos acoplados, basado en diferencias del diámetro del poro de conexión. Al igual que un pez en una nasa, las moléculas de colorante (círculos negros) pueden pasar de un astrocito a un oligodendrocito (A) pero no pueden volver en la otra dirección (B)."

Aunque este artículo pasó la evaluación en una revista científica respetada, se dirigieron diversas cartas al editor (1994), demostrando que el modelo de Robinson y colaboradores violaba la segunda ley de la termodinámica.

(a) Explique de qué modo el modelo viola la segunda ley. Pista: Considere qué le pasaría a la entropía del sistema si uno empezase con concentraciones iguales de colorante en el astrocito y oligodendrocito conectados por la unión en hendidura tipo "nasa".

(b) Explique por qué este modelo no puede funcionar con moléculas pequeñas, aunque permita pescar peces.

(c) Explique por qué una nasa *funciona* con los peces.

(d) Proporcione dos mecanismos plausibles para el transporte unidireccional de las moléculas de colorante entre las células que no viole la segunda ley de la termodinámica.

Referencias

Cartas al editor. (1994) *Science* **265**, 1017–1019.

Robinson, S.R., Hampson, E.C.G.M., Munro, M.N., & Vaney, D.I. (1993) Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science* **262**, 1072–1074.

> El problema de la fermentación alcohólica, del origen y naturaleza del cambio aparentemente espontáneo y misterioso que convierte el insípido jugo de la uva en vino estimulante, parece haber ejercido una fascinación sobre el pensamiento de filósofos naturales desde los tiempos más remotos.
>
> —*Arthur Harden,* Alcoholic Fermentation, *1923*

14

Glucólisis, gluconeogénesis y ruta de las pentosas fosfato

La glucosa ocupa una posición central en el metabolismo de plantas, animales y muchos microorganismos. Es relativamente rica en energía potencial, por lo que es un buen combustible; su oxidación completa a dióxido de carbono y agua transcurre con una variación de energía libre estándar de –2.840 kJ/mol. Almacenando la glucosa en forma de polímero de elevada masa molecular tal como el almidón o el glucógeno, una célula puede acumular grandes cantidades de unidades de hexosa, al tiempo que mantiene una osmolaridad citosólica relativamente baja. Cuando las necesidades energéticas de la célula aumentan, la glucosa puede liberarse a partir de estos polímeros de almacenamiento intracelular y utilizarse para producir ATP, ya sea aeróbica o anaeróbicamente.

La glucosa no es sólo un combustible excelente sino también un precursor extremadamente versátil, capaz de suministrar una gran cantidad de intermediarios metabólicos para las reacciones biosintéticas. Una bacteria tal como *Escherichia coli* puede obtener de la glucosa los esqueletos carbonados de cada uno de los aminoácidos, nucleótidos, coenzimas, ácidos grasos y otros intermediarios metabólicos necesarios para el crecimiento. El estudio completo de los destinos metabólicos de la glucosa abarcaría cientos o miles de transformaciones. En los animales y plantas superiores la glucosa tiene cuatro destinos principales: puede ser utilizada para la síntesis de polisacáridos complejos destinados al espacio extracelular; puede ser almacenada (en forma de polisacáridos o de sacarosa); puede ser oxidada a un compuesto de tres carbonos (piruvato) vía glucólisis para proporcionar ATP e intermediarios metabólicos, o puede ser oxidada por la ruta de las pentosas fosfato (fosfogluconato) para obtener ribosa 5-fosfato utilizada en la síntesis de ácidos nucleicos y NADPH para los procesos biosintéticos reductores **(Fig. 14–1)**.

Los organismos que no tienen acceso a la glucosa de otras fuentes deben fabricarla. Los organismos fotosintéticos forman glucosa reduciendo el CO_2 atmosférico a triosas para, seguidamente, convertir éstas en glucosa. Las células no fotosintéticas fabrican glucosa a partir de precursores más sencillos de tres o cuatro átomos de carbono mediante el proceso de la gluconeogénesis, invirtiendo de manera efectiva la glucólisis en una ruta que utiliza una gran parte de los enzimas glucolíticos.

En este capítulo se describen las reacciones individuales de la glucólisis, gluconeogénesis y la ruta de las pentosas fosfato, así como el significado funcional de cada ruta. También se describen los distintos destinos metabólicos del piruvato pro-

FIGURA 14–1 Principales rutas de utilización de la glucosa. Aunque no son los únicos destinos posibles de la glucosa, estas cuatro rutas son las más significativas en función de la cantidad de glucosa que fluye a través de las mismas en la mayoría de las células.

ducido en la glucólisis; se incluyen las fermentaciones utilizadas por muchos microorganismos en nichos anaeróbicos para producir ATP y que son explotados industrialmente como fuentes de etanol, ácido láctico y otros productos útiles para la industria. También se consideran las rutas que conducen diversos azúcares, obtenidos de mono-, di- y polisacáridos, hacia la ruta glucolítica. La discusión del metabolismo de la glucosa continúa en el Capítulo 15 en el que utilizamos los procesos de síntesis de glúcidos para ilustrar los muchos mecanismos mediante los que los organismos regulan las rutas metabólicas. Las rutas biosintéticas que van de la glucosa a los polisacáridos de la matriz extracelular y de la pared celular y a los polisacáridos de reserva se discuten en el Capítulo 20.

14.1 Glucólisis

En la **glucólisis** (del griego *glykys*, "dulce" y *lysis*, "romper") se degrada una molécula de glucosa en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, dando dos moléculas del compuesto de tres carbonos piruvato. Durante la secuencia de reacciones de la glucólisis, parte de la energía libre cedida por la glucosa se conserva en forma de ATP y NADH. La glucólisis fue la primera ruta metabólica elucidada y es, probablemente, la que se mejor conoce.

Desde el descubrimiento por Eduard Buchner en 1897 de la fermentación en extractos de células rotas de levadura, hasta la formulación de la ruta completa en la levadura (por Otto Warburg y Hans von Euler-Chelpin) y en el músculo (por Gustav Embden y Otto Meyerhof) en la década de 1930, las reacciones de la glucólisis en extractos de levadura y en músculo constituyeron un foco principal de la investigación bioquímica. El cambio filosófico que acompañó estos descubrimientos fue anunciado por Jacques Loeb en 1906:

> Gracias al descubrimiento de Buchner, la biología se liberó de otro fragmento de misticismo. La rotura del azúcar en CO_2 y alcohol ya no es el efecto de un "principio vital", al igual que no lo es la rotura del azúcar de caña por la invertasa. La historia de este problema es instructiva ya que nos previene de considerar problemas como fuera de nuestro alcance porque aún no hemos encontrado su solución.

El desarrollo de métodos para la purificación de enzimas, el descubrimiento y reconocimiento de la importancia de coenzimas tales como el NAD y el descubrimiento del papel fundamental del ATP y otros compuestos fosforilados fueron todos consecuencia de estudios sobre la glucólisis. Los enzimas glucolíticos de muchos organismos ya se han purificado y estudiado a fondo desde hace tiempo.

La glucólisis es una ruta central, casi universal, del catabolismo de la glucosa, la ruta con el mayor flujo de carbono en la mayoría de las células. En ciertos tejidos de mamífero y algunos tipos de células (eritrocitos, médula renal, cerebro y esperma, por ejemplo), la glucosa es la única fuente de energía metabólica a través de la glucólisis. Algunos tejidos vegetales modificados con el fin de almacenar almidón (tales como los tubérculos de patata) y algunas plantas acuáticas (los berros, por ejemplo) obtienen la mayor parte de su energía a partir de la glucólisis; muchos microorganismos anaeróbicos dependen totalmente de esta ruta metabólica.

Fermentación es un término general que indica degradación *anaeróbica* de la glucosa u otros nutrientes orgánicos, para obtener energía en forma de ATP. Debido a que los seres vivos aparecieron en primer lugar en una atmósfera carente de oxígeno, la degradación anaeróbica de la glucosa es probablemente el mecanismo biológico más antiguo para obtener energía a partir de moléculas combustibles orgánicas. La secuenciación del genoma de una gran variedad de organismos ha revelado que algunas arqueobacterias y algunos microorganismos parásitos carecen de uno o varios enzimas de la glucólisis si bien mantienen el núcleo de la ruta; probablemente utilizan formas variantes de la glucólisis. En el transcurso de la evolución la química de esta secuencia de reacciones se ha conservado completamente; los enzimas glucolíticos de los animales vertebrados son muy similares en secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional a sus homólogos de la levadura o de la espinaca. El proceso de la glucólisis sólo difiere de una especie a otra en los detalles de su regulación y en el destino posterior del piruvato formado. Los principios termodinámicos y los tipos de mecanismos reguladores en la glucólisis se encuentran en todas las rutas del metabolismo celular. El estudio de la glucólisis, de importancia crucial por sí mismo, puede servir, por tanto, como modelo de muchos aspectos de las rutas que se discuten más adelante en este libro.

Antes de examinar detalladamente cada paso de la ruta, observaremos la glucólisis en su conjunto.

Una visión global: la glucólisis tiene dos fases

La rotura de la glucosa, que tiene seis carbonos, en dos moléculas de piruvato, formado por tres carbonos, tiene lugar en 10 pasos, de los que los 5 primeros constituyen la *fase preparatoria* (**Fig. 14–2a**). En estas reacciones la glucosa es fosforilada en primer lugar en el grupo hidroxilo en C-6 (paso ①). La D-glucosa 6-fosfato así formada se convierte en D-fructosa 6-fosfato (paso ②), la cual vuelve a ser fosforilada, esta vez en C-1, dando D-fructosa 1,6-bisfosfato (paso ③). El ATP es el dador del grupo fosforilo en ambas fosforilaciones. Dado que todos los derivados de azúcares en la glucólisis son isómeros D, omitiremos normalmente esta designación excepto cuando se trate de dar énfasis a la estereoquímica.

Hans von Euler-Chelpin, 1873–1964

Gustav Embden, 1874–1933

Otto Meyerhof, 1884–1951

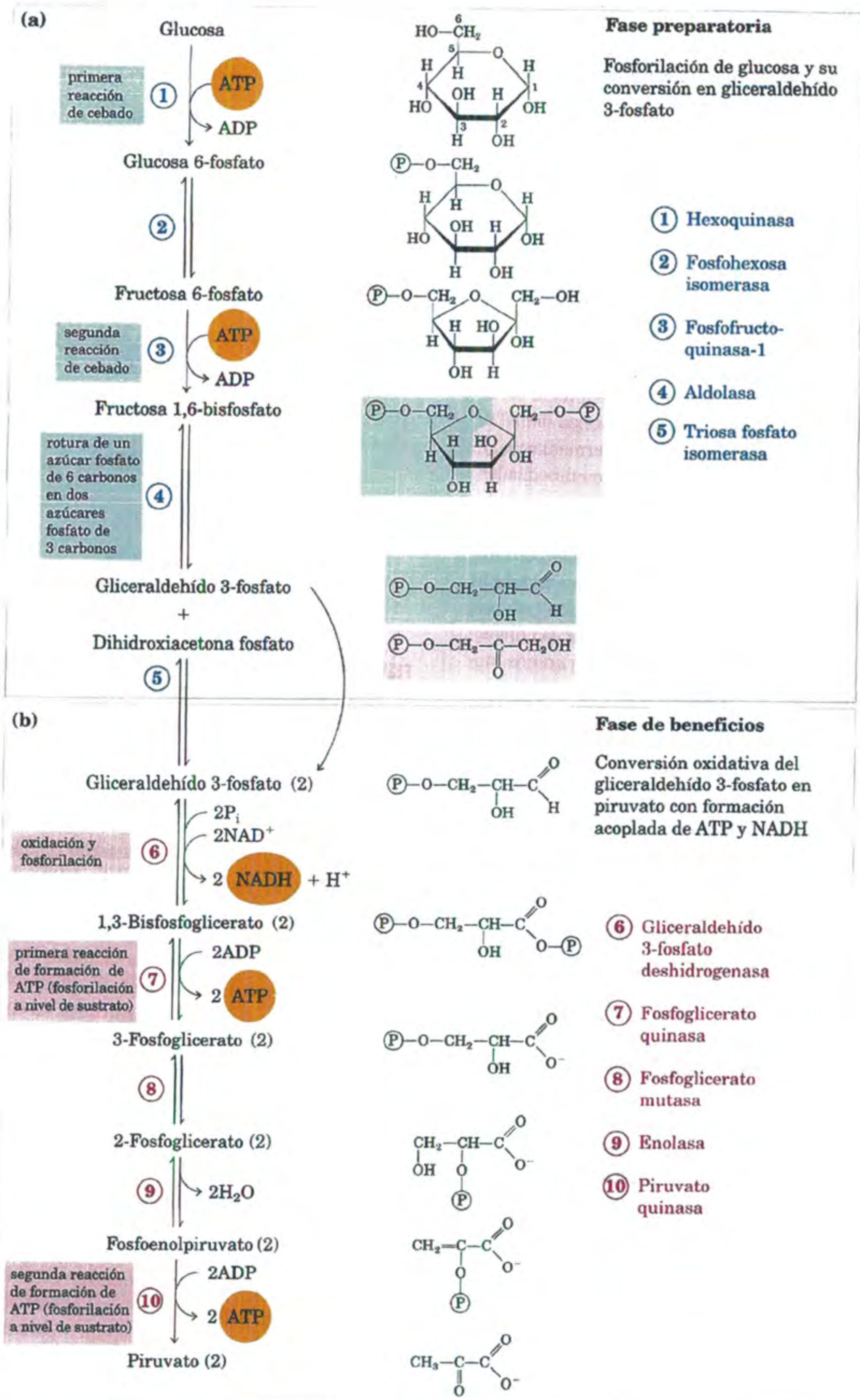


FIGURA 14–2 Las dos fases de la glucólisis. Por cada molécula de glucosa que pasa a través de la fase preparatoria **(a)** se forman dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato; ambas pasan a la fase de beneficios **(b)**. El piruvato es el producto final de la segunda fase de la glucólisis. Por cada molécula de glucosa se consumen dos de ATP en la fase preparatoria y se producen cuatro de ATP en la fase de beneficios, dando un rendimiento neto de dos ATP por molécula de glucosa convertida en piruvato. El número al lado de cada paso de reacción se corresponde con su número en la discusión del texto. Hay que tener presente que cada grupo fosforilo, representado aquí como Ⓟ, tiene dos cargas negativas ($-PO_3^{2-}$).

La fructosa 1,6-bisfosfato se parte a continuación dando dos moléculas de tres carbonos, la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato (paso ④); éste es el paso de la "lisis" del que proviene el nombre del proceso. La dihidroxiacetona fosfato se isomeriza a una segunda molécula de gliceraldehído 3-fosfato (paso ⑤), lo que pone punto final a la primera fase de la glucólisis. Desde una perspectiva química, la isomerización del paso ② es crítica para establecer las reacciones de fosforilación y de rotura del enlace C—C de los pasos ③ y ④, tal como se detalla más adelante. Observe que se han de invertir dos moléculas de ATP antes de la rotura de la glucosa en dos piezas de tres carbonos; posteriormente se generarán unos importantes dividendos a cambio de esta inversión. En resumen: en la fase preparatoria de la glucólisis se invierte la energía del ATP, elevando el contenido de energía libre de los intermediarios, y las cadenas de carbono de todas las hexosas metabolizadas se convierten en un producto común, el gliceraldehído 3-fosfato.

El retorno energético tiene lugar en la *fase de beneficios* de la glucólisis (Fig. 14–2b). Cada molécula de gliceraldehído 3-fosfato se oxida y fosforila por fosfato inorgánico (*no* por ATP) formando 1,3-bisfosfoglicerato (paso ⑥). En la conversión de las dos moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato en dos moléculas de piruvato (pasos ⑦ a ⑩) se libera energía. Gran parte de esta energía se conserva mediante la fosforilación acoplada de dos moléculas de ADP a ATP. Al final, el rendimiento neto es de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa utilizada, ya que se han invertido dos moléculas de ATP en la fase preparatoria de la glucólisis. También se conserva energía en la fase de beneficios mediante la formación de dos moléculas del transportador de electrones NADH por molécula de glucosa.

En las reacciones secuenciales de la glucólisis tienen un especial interés tres tipos de transformaciones químicas: (1) la degradación del esqueleto carbonado de la glucosa que produce piruvato, (2) la fosforilación del ADP a ATP por parte de compuestos fosfato de alta energía, formados durante la glucólisis, y (3) la transferencia de un ión hidruro al NAD^+, formándose NADH.

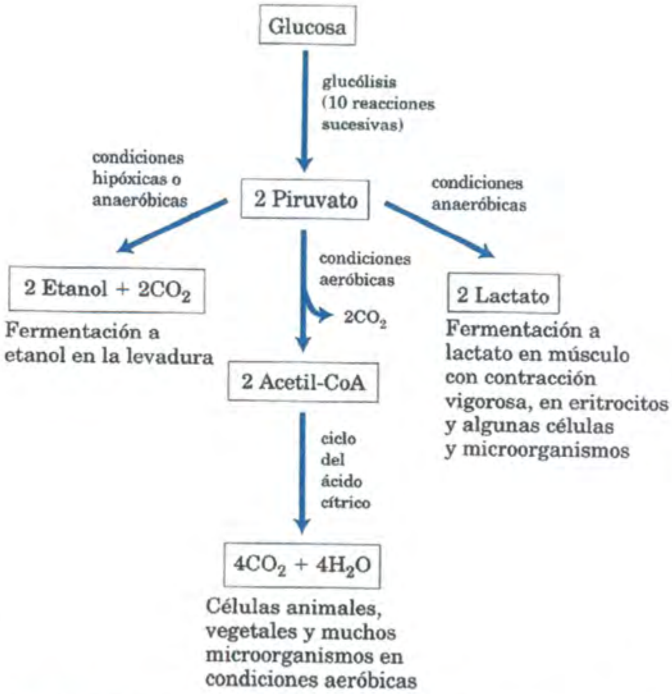


FIGURA 14–3 Los tres posibles destinos catabólicos del piruvato producido en la glucólisis. El piruvato también sirve como precursor en muchas reacciones anabólicas, no mostradas aquí.

Destinos del piruvato Si dejamos de lado algunas variantes interesantes dentro de las bacterias, el piruvato formado en la glucólisis puede continuar siendo metabolizado siguiendo una de tres rutas catabólicas distintas. En los organismos o tejidos aeróbicos, en condiciones aeróbicas, la glucólisis sólo constituye el primer paso en la degradación completa de la glucosa **(Fig. 14–3)**. El piruvato se oxida, con pérdida de su grupo carboxilo en forma de CO_2, dando el grupo acetilo del acetil-coenzima A, que es oxidado seguidamente de manera completa a CO_2 por el ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16). Los electrones de estas oxidaciones pasan al O_2 a través de una cadena de transportadores en la mitocondria, formando H_2O. La energía procedente de las reacciones de transferencia electrónica impulsa la síntesis de ATP en la mitocondria (Capítulo 19).

La segunda ruta para el piruvato es su reducción a lactato vía **fermentación del ácido láctico.** Cuando el músculo esquelético durante la contracción vigorosa ha de funcionar con bajas concentraciones de oxígeno (**hipoxia**), el NADH no puede ser reoxidado a NAD^+, siendo este último el aceptor de electrones imprescindible para la posterior oxidación del piruvato. En estas condiciones, el piruvato se reduce a lactato y acepta los electrones del NADH, regenerando así el NAD^+ necesario para la continuación de la glucólisis. Algunos tipos celulares y tejidos (retina y eritrocitos, por ejemplo) convierten la glucosa en lactato incluso en condiciones aeróbicas. En algunos microorganismos, el producto de la glucólisis en condiciones anaeróbicas es también el lactato (Fig. 14–3).

La tercera ruta principal del catabolismo del piruvato conduce al etanol. En algunos tejidos vegetales y en ciertos invertebrados, protistas y microorganismos tales como la levadura de la cerveza o de panificación, el piruvato se convierte, bajo condiciones anaeróbicas o de hipoxia, en etanol y CO_2, proceso denominado **fermentación etanólica** (o **fermentación alcohólica**) (Fig. 14–3).

La oxidación del piruvato es un proceso catabólico importante, pero el piruvato tiene también otros destinos anabólicos. Puede, por ejemplo, proporcionar el esqueleto carbonado para la síntesis del aminoácido alanina o para la síntesis de ácidos grasos. En capítulos posteriores estudiaremos estas reacciones anabólicas del piruvato.

Formación de ATP y NADH acoplada a la glucólisis Durante la glucólisis parte de la energía de la molécula de glucosa se conserva en forma de ATP, mientras que la mayor parte de la misma permanece en el producto, piruvato. La ecuación global de la glucólisis es:

$$\text{Glucosa} + 2NAD^+ + 2ADP + 2P_i \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2NADH + 2H^+ + 2ATP + 2H_2O \quad (14\text{–}1)$$

Por cada molécula de glucosa degradada a piruvato, se generan dos moléculas de ATP a partir de ADP y P_i y se producen dos moléculas de NADH por reducción del NAD^+. El aceptor de hidrógeno en esta reacción es el NAD^+ (véase la Fig. 13–24), unido a un pliegue de Rossman tal como se muestra en la Figura 13–25.

La reducción del NAD^+ se realiza mediante transferencia enzimática de un ión hidruro (:H^-) del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato al anillo de nicotinamida del NAD^+, dando el coenzima reducido NADH. El otro átomo de hidrógeno se libera a la solución en forma de H^+.

Podemos ahora dividir la ecuación de la glucólisis en dos procesos: el primero consiste en la conversión de la glucosa en piruvato, que es exergónica:

$$\text{Glucosa} + 2NAD^+ \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2NADH + 2H^+ \qquad (14\text{–}2)$$
$$\Delta G_1'^\circ = -146\ \text{kJ/mol}$$

y el segundo en la formación de ATP a partir de ADP y P_i, reacción que es endergónica:

$$2ADP + 2P_i \longrightarrow 2ATP + 2H_2O \qquad (14\text{–}3)$$
$$\Delta G_2'^\circ = 2(30{,}5\ \text{kJ/mol}) = 61{,}0\ \text{kJ/mol}$$

La suma de las ecuaciones 14–2 y 14–3 es la variación global de energía libre estándar de la glucólisis, $\Delta G_s'^\circ$:

$$\Delta G_s'^\circ = \Delta G_1'^\circ + \Delta G_2'^\circ = -146\ \text{kJ/mol} + 61\ \text{kJ/mol}$$
$$= -85\ \text{kJ/mol}$$

Tanto en condiciones estándar como intracelulares (no estándar), la glucólisis es un proceso esencialmente irreversible, conducido hasta su totalidad por un gran descenso neto de energía libre.

Energía remanente en el piruvato La glucólisis sólo libera una pequeña fracción de la energía total disponible de la molécula de glucosa; las dos moléculas de piruvato formadas por la glucólisis aún contienen la mayor parte de la energía química potencial obtenible de la molécula de glucosa, energía que se puede extraer mediante reacciones oxidativas en el ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16) y en la fosforilación oxidativa (Capítulo 19).

Importancia de los intermediarios fosforilados Cada uno de los nueve intermedios glucolíticos entre la glucosa y el piruvato está fosforilado (Fig. 14–2). El grupo fosforilo parece tener tres funciones.

1. Como sea que la membrana plasmática carece de transportadores para los azúcares fosforilados, los intermediarios glucolíticos fosforilados no pueden abandonar la célula. Después de la fosforilación inicial, la célula ya no ha de gastar más energía para retener los intermediarios fosforilados, a pesar de la gran diferencia de las concentraciones intra y extracelulares.
2. Los grupos fosforilo son componentes esenciales en la conservación enzimática de la energía metabólica. La energía liberada en la rotura de enlaces fosfoanhídridos (como por ejemplo los del ATP) se conserva parcialmente en la formación de ésteres fosfato tales como la glucosa 6-fosfato. Los compuestos fosfato de alta energía que se forman en la glucólisis (1,3-bisfosfoglicerato y fosfoenolpiruvato) donan grupos fosforilo al ADP para formar ATP.
3. La fijación de los grupos fosfato a los sitios activos de los enzimas disminuyen la energía de activación y aumenta la especificidad de las reacciones enzimáticas (Capítulo 6). Los grupos fosfato del ADP, ATP y los intermediarios glucolíticos forman complejos con el Mg^{2+}, siendo los sitios de unión a sustrato de muchos enzimas glucolíticos específicos para esos complejos de Mg^{2+}. Prácticamente todos los enzimas glucolíticos requieren Mg^{2+} para ejercer su actividad.

La fase preparatoria de la glucólisis precisa ATP

En la fase preparatoria de la glucólisis se invierten dos moléculas de ATP y se rompe la cadena de hexosa en dos triosas fosfato. El conocimiento de que las hexosas *fosforiladas* eran intermediarios de la glucólisis fue lento y casual. En 1906, Arthur Harden y William Young trataron de comprobar su hipótesis de que los inhibidores de los enzimas proteolíticos estabilizarían los enzimas fermentadores de la glucosa en el extracto de levadura. Añadieron suero sanguíneo (que ya se sabía que contenía inhibidores de enzimas proteolíticos) a extractos de levaduras y observaron la estimulación previsible del metabolismo de la glucosa.

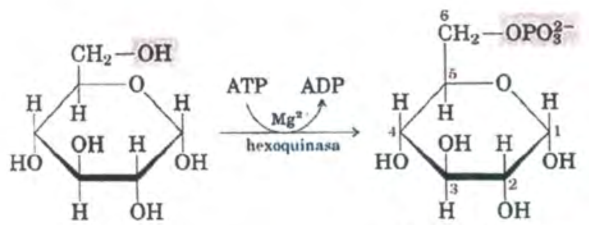
No obstante, en un experimento de control diseñado para demostrar que la ebullición del suero destruía la actividad estimuladora, descubrieron que el suero hervido era igualmente efectivo como estimulante de la glucólisis. El examen cuidadoso del contenido del suero hervido demostró que el responsable de la estimulación era el fosfato inorgánico. Harden y Young descubrieron pronto que la glucosa añadida a su extracto de levadura era convertida en hexosa bisfosfato (el "éster de Harden–Young", finalmente identificado como fructosa 1,6–bisfosfato).

Este fue solamente el principio de una larga serie de investigaciones sobre el papel de los ésteres orgánicos del fosfato en bioquímica que nos ha llevado a nuestro actual conocimiento sobre el papel central de la transferencia del grupo fosforilo en biología.

Arthur Harden, 1865–1940

William Young, 1878–1942

① Fosforilación de la glucosa En el primer paso de la glucólisis, la glucosa se activa para reacciones posteriores mediante la fosforilación en el C-6 dando **glucosa 6-fosfato;** el ATP es el dador de fosforilo:



Glucosa Glucosa 6-fosfato

$\Delta G'^{\circ} = -16{,}7$ kJ/mol

Esta reacción, que es irreversible en condiciones intracelulares, está catalizada por la **hexoquinasa.** Recuerde que las quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosforilo terminal del ATP a algún nucleófilo aceptor (véase la Fig. 13–20). Las quinasas son una subclase de transferasas (véase la Tabla 6–3).

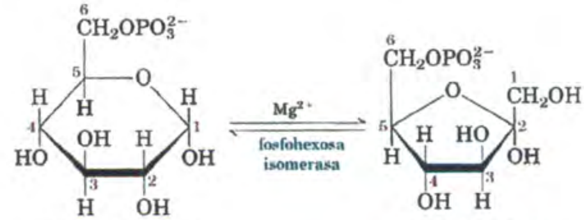
El aceptor en el caso de la hexoquinasa es una hexosa, normalmente la D-glucosa, aunque la hexoquinasa también cataliza la fosforilación de otras hexosas comunes, tales como la D-fructosa y la D-manosa.

La hexoquinasa, al igual que muchas quinasas, necesita Mg^{2+} para su actividad, porque el verdadero sustrato del enzima no es el ATP^{4-} sino el complejo $MgATP^{2-}$ (véase la Fig. 13–12). El Mg^{2+} apantalla las cargas negativas de los grupos fosforilo del ATP haciendo que el átomo de fósforo terminal sea una diana más fácil para el ataque nucleofílico por un —OH de la glucosa. La hexoquinasa experimenta un cambio profundo en su forma, un acoplamiento inducido, cuando fija la glucosa; dos dominios de la proteína se desplazan acercándose unos 8 Å cuando se une el ATP (véase la Fig. 6–22). Este movimiento acerca el ATP a una molécula de glucosa también unida al enzima y bloquea el acceso de agua (del disolvente), el cual podría de otro modo entrar en el sitio activo y atacar (hidrolizar) los enlaces fosfoanhídrido del ATP. Al igual que los otros nueve enzimas de la glucólisis la hexoquinasa es una proteína citosólica soluble.

La hexoquinasa se encuentra en casi todos los organismos. El genoma humano codifica cuatro hexoquinasas diferentes (I a IV) que catalizan todas ellas la misma reacción. Dos o más enzimas que catalizan la misma reacción pero que están codificados por genes distintos se denominan **isozimas** (véase el Recuadro 15–2).

Uno de los isozimas pesente en los hepatocitos, la hexoquinasa IV (también llamada glucoquinasa) se diferencia de otras formas de hexoquinasas por sus propiedades cinéticas y de regulación con consecuencias fisiológicas importantes que se describen en la Sección 15.3.

② Conversión de la glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato El enzima **fosfohexosa isomerasa (fosfoglucosa isomerasa)** cataliza la isomerización reversible de la glucosa 6-fosfato, que es una aldosa, en **fructosa 6-fosfato**, que es una cetosa:

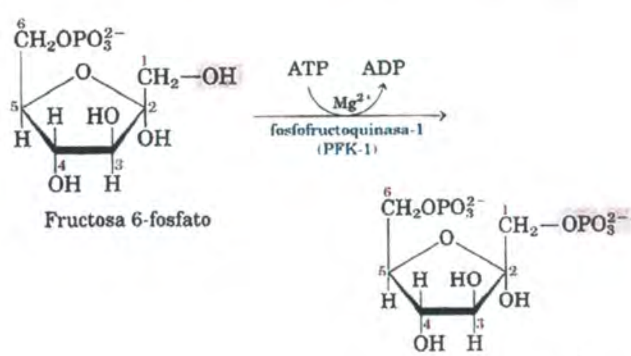


Glucosa 6-fosfato Fructosa 6-fosfato

$\Delta G'^{\circ} = 1{,}7$ kJ/mol

El mecanismo de esta reacción se realiza a través de un intermedio enediol (**Figura 14–4**). La reacción transcurre fácilmente en cualquiera de las dos direcciones, tal como lo predice la variación relativamente pequeña de la energía libre estándar. Esta isomerización tiene un carácter crítico en la química global de la ruta glucolítica ya que el reordenamiento de los grupos carbonilo e hidroxilo en C-1 y C-2 es un preludio necesario para los siguientes pasos. La fosforilación que tiene lugar en la siguiente reacción (paso ③) requiere que el grupo en C-1 se convierta primero de carbonilo en alcohol y en la reacción posterior (paso ④) la rotura del enlace entre C-3 y C-4 requiere la presencia de un grupo carbonilo en C-2 (p. 497).

③ Fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato En la segunda de las dos reacciones activadoras de la glucólisis, la **fosfofructoquinasa-1 (PFK-1)** cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP a la fructosa 6-fosfato para dar **fructosa 1,6-bisfosfato:**



Fructosa 6-fosfato

Fructosa 1,6-bisfosfato

$\Delta G'^{\circ} = -14{,}2$ kJ/mol

CONVENCIÓN CLAVE: Los compuestos que contienen dos grupos fosfato o fosforilo unidos a posiciones diferentes de la molécula se denominan *bisfosfatos* (o compuestos *bisfosfo*); por ejemplo, la fructosa 1,6-bisfosfato y el 1,3-bisfosfoglicerato. Los compuestos con dos fosfatos unidos entre sí en forma de grupo pirofosforilo se denominan *difosfatos*; por ejemplo, la adenosina difosfato (ADP). En la nomenclatura de los *trisfosfatos* (tales como el inositol 1,4,5-trisfosfato; véase la p. 432) y los *trifosfatos* (como el adenosina trifosfato, ATP) rigen reglas semejantes. ■

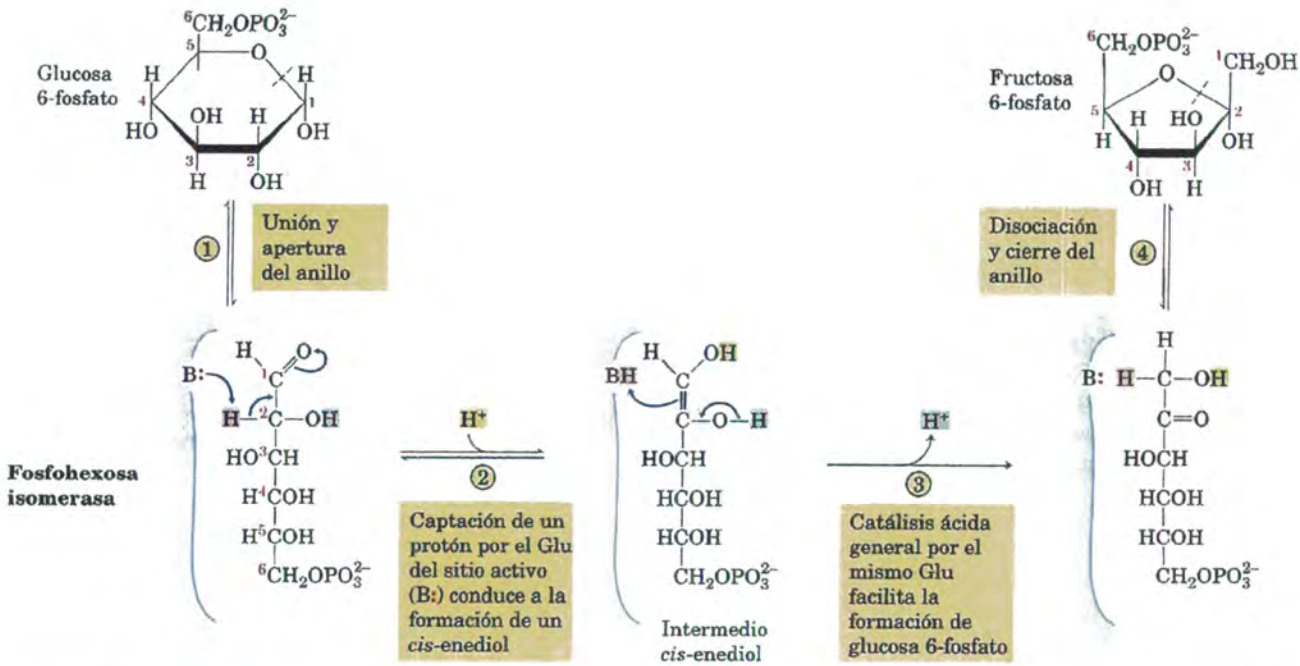


FIGURA DE MECANISMO 14–4 Reacción de la fosfohexosa isomerasa. Las reacciones de abertura y cierre del anillo (pasos ① y ④) están catalizadas por un residuo His del sitio activo, mediante un mecanismo aquí omitido por motivos de claridad. El protón (rosa) inicialmente en C-2 se hace más fácilmente extraíble por eliminación electrónica del carbonilo adyacente y el grupo hidroxilo cercano. Después de su transferencia desde el C-2 al residuo Glu del sitio activo (un ácido débil), el protón se intercambia libremente con la solución que lo rodea; esto es, el protón extraído de C-2 en el paso ② no es necesariamente el mismo que se añade a C-1 en el paso ③.

Mecanismo de la fosfohexosa isomerasa

El enzima que forma fructosa 1,6-bisfosfato se denomina PFK-1 para distinguirlo de un segundo enzima (PFK-2) que cataliza la formación de fructosa 2,6-bisfosfato a partir de fructosa 6-fosfato en una ruta separada (las funciones de la PFK-2 y de la fructosa 2,6-bisfosfato se discuten en el Capítulo 15). La reacción de la PFK-1 es prácticamente irreversible en condiciones celulares y es la primera etapa "comprometida" en la ruta glucolítica; la glucosa 6-fosfato y la fructosa 6-fosfato tienen otros destinos posibles, pero la fructosa 1,6-bisfosfato está destinada a la glucólisis.

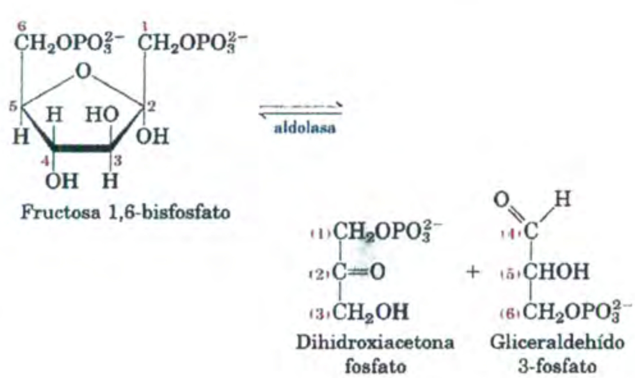
Algunas bacterias y protistas y quizá todas las plantas tienen una fosfofructoquinasa que utiliza pirofosfato (PP_i), no ATP, como dador de grupo fosforilo en la síntesis de fructosa 1,6-bisfosfato:

$$\text{Fructosa 6-fosfasto} + PP_i \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{fructosa 1,6-bisfosfato} + P_i$$
$$\Delta G'^{\circ} = -2{,}9 \text{ kJ/mol}$$

La fosfofructoquinasa-1 está sujeta a una compleja regulación alostérica; su actividad aumenta siempre que se agota el suministro de ATP en las células o cuando existe un exceso de los productos de rotura del ATP, es decir, el ADP y el AMP (especialmente el segundo). El enzima es inhibido siempre que la célula tenga mucho ATP y disponga de un buen suministro de otros combustibles, tales como ácidos grasos.

En algunos organismos, la fructosa 2,6-bisfosfato (no confundir con el producto de reacción de la PFK-1, fructosa1,6-bisfosfato) es un potente activador alostérico de la PFK-1. La ribulosa 5-fosfato, intermediario de la ruta de las pentosas fosfato discutida más adelante en este capítulo, también activa de modo indirecto la fosfofructoquinasa. Los múltiples niveles de regulación de este paso de la glucólisis se discutirán con más detalle en el Capítulo 15.

④ **Rotura de la fructosa 1,6-bisfosfato** El enzima **fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa**, a menudo llamado simplemente **aldolasa,** cataliza una condensación aldólica reversible (véase la Fig. 13–4). La fructosa 1,6-bisfosfato se rompe dando dos triosas fosfato diferentes, el **gliceraldehído 3-fosfato,** una aldosa y la **dihidroxiacetona fosfato,** una cetosa:

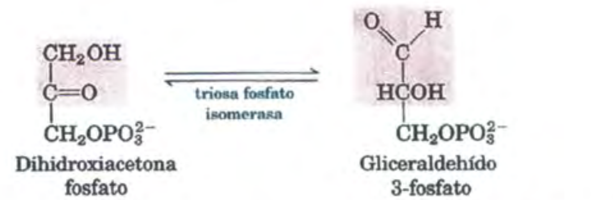


$$\Delta G'^{\circ} = 23{,}8 \text{ kJ/mol}$$

Existen dos clases de aldolasas. Las aldolasas de la clase I, presentes en animales y plantas, utilizan el mecanismo mostrado en la **Figura 14–5**. Los enzimas de la clase II, de hongos y bacterias, no forman la base de Schiff intermedia. En lugar de ello, contienen un ión zinc en el sitio activo coordinado con el oxígeno carbonílico en C-2; el Zn^{2+} polariza el grupo carbonilo y estabiliza el intermedio enolato creado en el paso de rotura del enlace C—C.

Aunque la reacción de la aldolasa tiene una variación de energía libre estándar fuertemente positiva en la dirección de la rotura de la fructosa 1,6-bisfosfato, a las bajas concentraciones de reactivos presentes en las células, la variación de energía libre real es pequeña por lo que la reacción de la aldolasa es fácilmente reversible. Veremos más adelante que la aldolasa actúa en la dirección inversa durante el proceso de la gluconeogénesis (véase la Fig. 14–16).

⑤ **Interconversión de las triosas fosfato** Solamente una de las dos triosas fosfato formadas por la aldolasa, el gliceraldehído 3-fosfato, puede ser degradada directamente en los siguientes pasos de la glucólisis. El otro producto, la dihidroxiacetona fosfato, se convierte rápida y reversiblemente en gliceraldehído 3-fosfato por el quinto enzima de la secuencia glucolítica, la **triosa fosfato isomerasa:**



$\Delta G'^{\circ} = 7{,}5$ kJ/mol

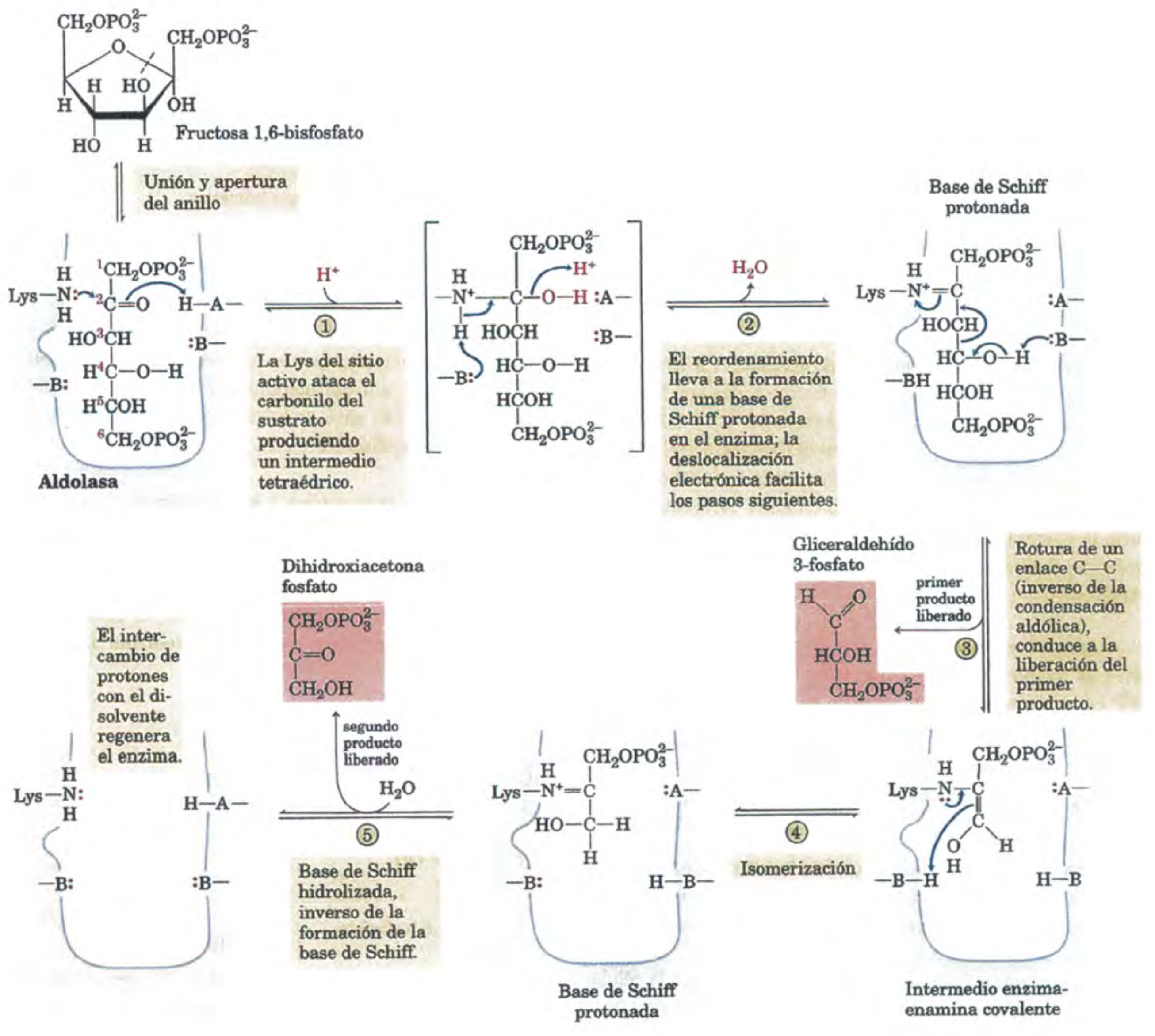


FIGURA DE MECANISMO 14–5 Reacción de la aldolasa clase I. La reacción que se muestra aquí es el inverso de una condensación aldólica. Observe que la rotura entre C-3 y C-4 depende de la presencia del grupo carbonilo en C-2. A y B representan residuos aminoácidos que actúan como ácido (A) o base (B) general.

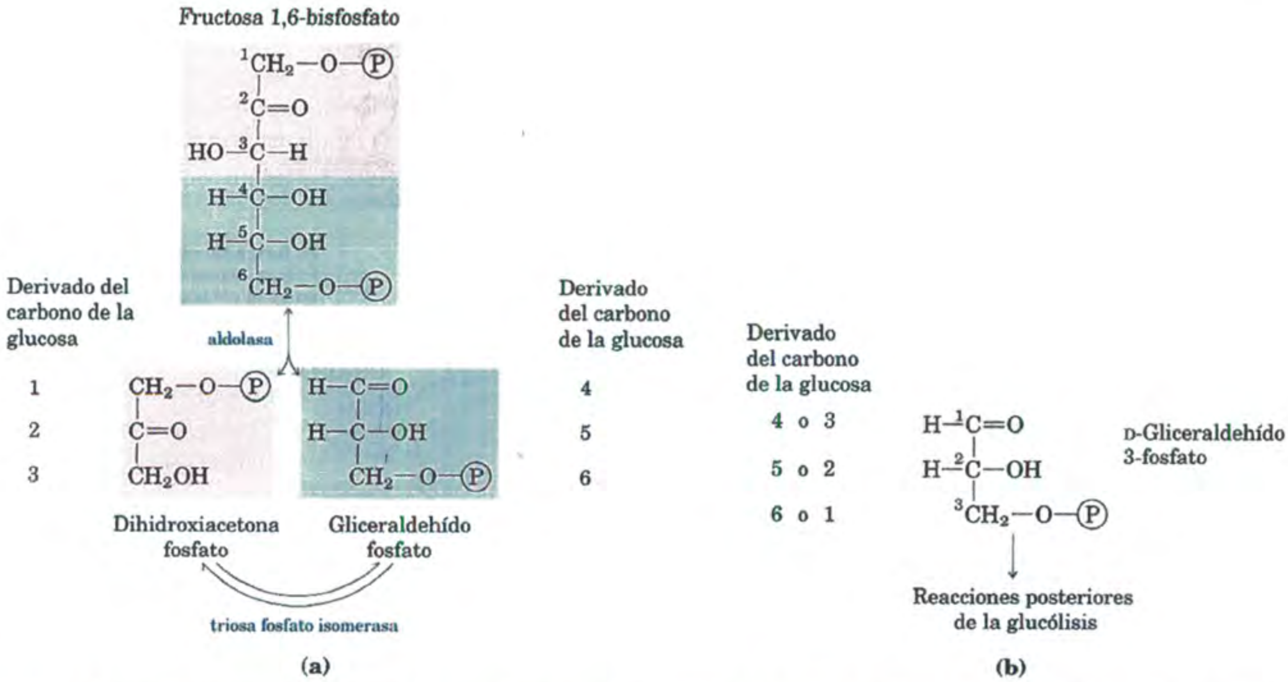


FIGURA 14–6 Destino de los átomos de carbono de la glucosa en la formación de gliceraldehído 3-fosfato. (a) Origen de los carbonos en los dos productos de tres carbonos de las reacciones de la aldolasa y de la triosa fosfato isomerasa. El producto final de las dos reacciones es gliceraldehído 3-fosfato (dos moléculas). (b) Cada uno de los átomos de carbono del gliceraldehído 3-fosfato proviene de uno u otro de dos carbonos específicos de la glucosa. Observe que la numeración de los átomos de carbono del gliceraldehído 3-fosfato no es idéntica a la numeración de los átomos de carbono de la glucosa de la que procede. En el gliceraldehído 3-fosfato, el grupo funcional más complejo (el carbonilo) se especifica como C-1. Este cambio en la numeración es importante para interpretar experimentos con glucosa en los que sólo se marca un carbono con un radioisótopo. (Véanse los problemas 6 y 9 al final de este capítulo.)

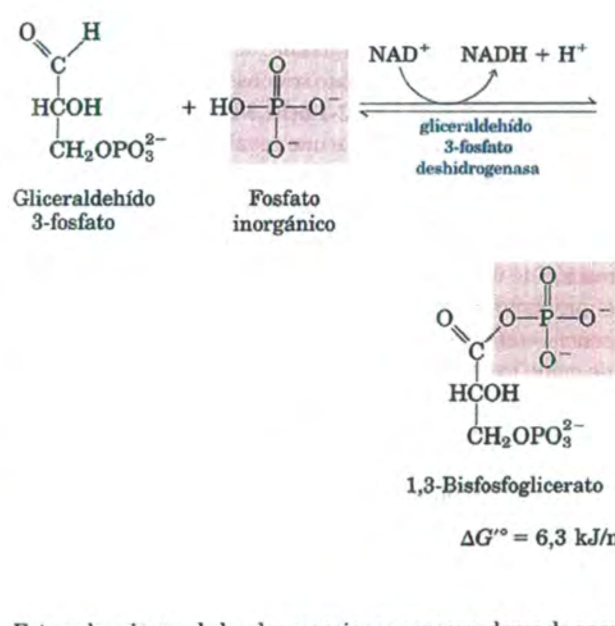
El mecanismo de reacción es similar a la reacción promovida por la fosfohexosa isomerasa en el paso ② de la glucólisis (Fig. 14–4). Después de la reacción de la triosa fosfato isomerasa, los carbonos derivados de C-1, C-2 y C-3 de la glucosa inicial son químicamente indistinguibles de los carbonos C-6, C-5 y C-4, respectivamente **(Fig. 14–6)**; las dos "mitades" de la glucosa producen gliceraldehído 3-fosfato.

Esta reacción completa la fase preparatoria de la glucólisis. La molécula de hexosa se ha fosforilado en C-1 y C-6 y a continuación se ha partido para formar dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato.

La fase de beneficios de la glucólisis produce ATP y NADH

La fase de beneficios de la glucólisis (Fig. 14–2b) incluye los pasos de fosforilación conservadores de energía en los que parte de la energía libre de la molécula de glucosa se conserva en forma de ATP y NADH. Recuerde que una molécula de glucosa produce dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato; las dos mitades de la molécula de glucosa siguen la misma ruta en la segunda fase de la glucólisis. La conversión de dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato en dos de piruvato se acompaña de la formación de cuatro moléculas de ATP a partir de ADP. Sin embargo, el rendimiento neto de ATP por molécula de glucosa degradada es sólo de dos, porque se han invertido dos moléculas de ATP en la fase preparatoria de la glucólisis para fosforilar los dos extremos de la molécula de hexosa.

⑥ Oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato El primer paso de esta fase de beneficios es la conversión del gliceraldehído 3-fosfato en **1,3-bisfosfoglicerato,** catalizado por el **gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa:**



$\Delta G'^{\circ} = 6{,}3$ kJ/mol

Esta es la primera de las dos reacciones conservadoras de energía de la glucólisis que conducen en último término a la formación de ATP. El grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato es oxidado, no a un grupo carboxílico libre sino a un anhídrido de ácido carboxílico con ácido fosfórico. Este tipo de anhídrido, denominado

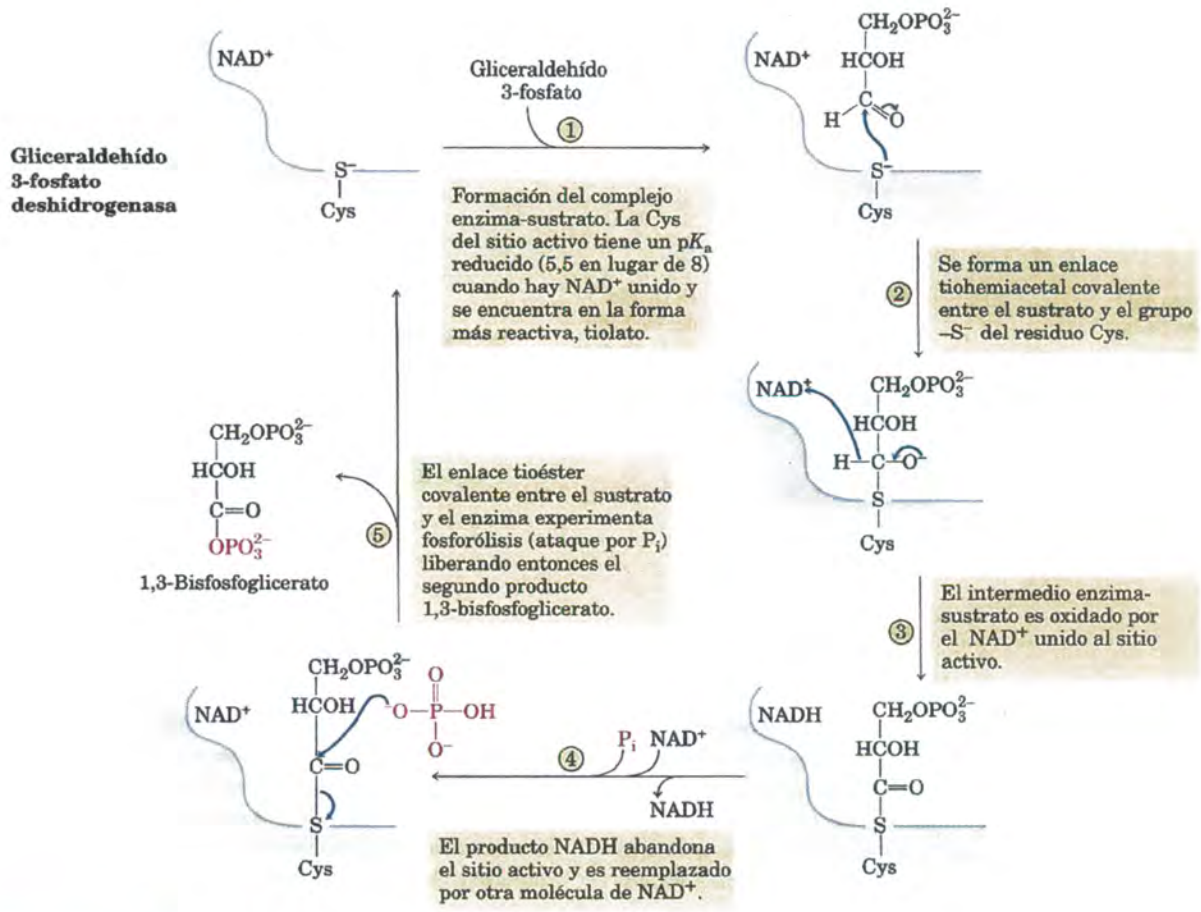


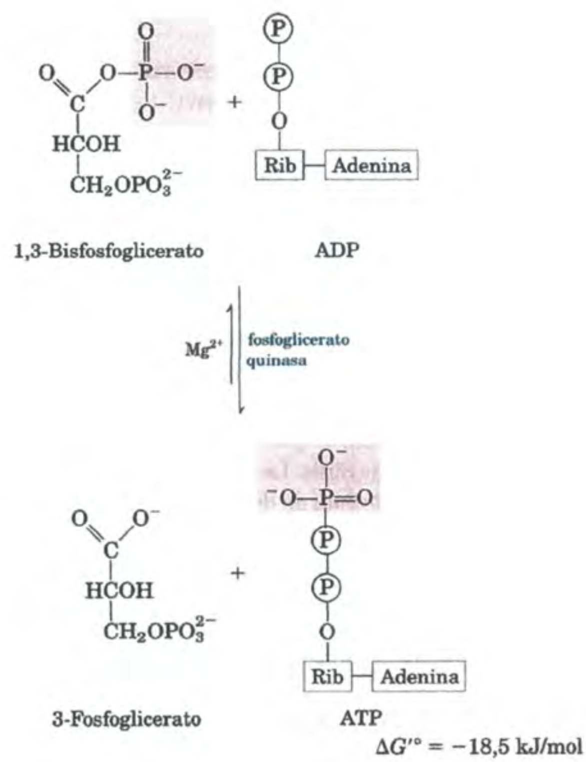
FIGURA DE MECANISMO 14–7 **Reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.**

acil fosfato, presenta una energía libre de hidrólisis estándar muy elevada ($\Delta G'^{\circ}$ = −49,3 kJ/mol; véanse la Fig. 13–14 y la Tabla 13–6). Gran parte de la energía libre de oxidación del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato se conserva mediante la formación del grupo acil fosfato en C-1 del 1,3-bisfosfoglicerato.

El gliceraldehído 3-fosfato se une covalentemente a la deshidrogenasa durante la reacción **(Fig. 14–7)**. El grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato reacciona con el grupo —SH de un residuo Cys esencial del sitio activo, en una reacción análoga a la formación de un hemiacetal (véase la Fig. 7–5), pero en este caso el producto es un *tio*hemiacetal. La reacción del residuo Cys esencial con un metal pesado tal como el Hg^{2+} inhibe el enzima de modo irreversible.

La cantidad de NAD+ en una célula (≤10^{-5} M) es muy inferior a la cantidad de glucosa metabolizada en unos pocos minutos. La glucólisis pronto se detendría si el NADH formado en este paso de la glucólisis no se reoxidara y reciclara continuamente. Volveremos a discutir este reciclado del NAD⁺ más adelante en este capítulo.

⑦ **Transferencia de fosforilo desde el 1,3–bisfosfoglicerato al ADP** El enzima **fosfoglicerato quinasa** transfiere el grupo fosforilo de alta energía desde el grupo carboxilo del 1,3-bisfosfoglicerato al ADP, obteniéndose ATP y **3-fosfoglicerato:**



$\Delta G'^{\circ}$ = −18,5 kJ/mol

Observe que el nombre de fosfoglicerato quinasa es por la reacción inversa en la que se transfiere un grupo fosforilo desde el ATP al 3-fosfoglicerato. Como todos los enzimas, cataliza la reacción en ambas direcciones. Este enzima actúa en la dirección que indica su nombre durante la gluconeogénesis (véase la Fig. 14–16) y durante la asimilación fotosintética del CO_2 (véase la Fig. 20–4). En la glucólisis la reacción catalizada se da tal como se ha mostrado anteriormente, en la dirección de síntesis de ATP.

Los pasos ⑥ y ⑦ de la glucólisis constituyen, conjuntamente, un proceso de acoplamiento de energía en donde el 1,3-bisfosfoglicerato es el intermediario común; se forma en la primera reacción (que sería endérgonica como sistema aislado), y se transfiere su grupo acil fosfato al ADP en la segunda reacción (que es fuertemente exergónica). La suma de estas dos reacciones es:

$$\text{Gliceraldehído 3-fosfato} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{3-fosfoglicerato} + \text{ATP} + \text{NADH} + \text{H}^+$$
$$\Delta G'^\circ = -12{,}2 \text{ kJ/mol}$$

De esta manera la reacción global es exergónica.

Recuerde del Capítulo 13 que la variación de energía libre real, ΔG, viene determinada por la variación de energía libre estándar, $\Delta G'^\circ$, y el cociente de acción de masas, Q, que es el cociente [productos]/[reactivos] (véase Ec. 13–4). Para el paso ⑥

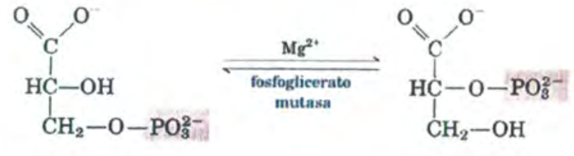
$$\Delta G = \Delta G'^\circ + RT \ln Q$$
$$= \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[\text{1,3-bisfosfoglicerato}][\text{NADH}]}{[\text{gliceraldehído 3-fosfato}][\text{P}_i][\text{NAD}^+]}$$

Observe que no se incluye el [H+] en Q. En los cálculos bioquímicos siempre se da por supuesto que [H+] es una constante (10^{-7} M), incluyéndose esta constante en la definición de $\Delta G'^\circ$ (p. 491).

Cuando el cociente de acción de masas es inferior a 1,0, su logaritmo natural tiene un signo negativo. El paso ⑦, al consumir el producto del paso ⑥ (1,3-bisfosfoglicerato), mantiene la [1,3-bisfosfoglicerato] relativamente baja en el estado estacionario, por lo que Q del proceso de acoplamiento de energía global permanece bajo. Cuando Q es pequeño, la contribución de ln Q puede hacer que ΔG sea fuertemente negativa. Esta es, simplemente, otra forma de mostrar que las dos reacciones, pasos ⑥ y ⑦, están acopladas mediante un intermediario común.

El resultado final de estas reacciones acopladas, ambas reversibles en las condiciones celulares, es que la energía liberada en la oxidación de un grupo aldehído a carboxilato se conserva mediante la formación acoplada de ATP a partir de ADP y P_i. La formación de ATP por transferencia del grupo fosforilo a partir de un sustrato tal como el 1,3-bisfosfoglicerato se conoce como **fosforilación a nivel de sustrato** para distinguir este mecanismo de la **fosforilación ligada a la respiración.** La fosforilación a nivel de sustrato implica enzimas solubles e intermediarios químicos (1,3-bisfosfoglicerato en este caso). La fosforilación ligada a la respiración, por otro lado, implica enzimas de membrana y un gradiente transmembrana de protones (Capítulo 19).

⑧ Conversión del 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato El enzima **fosfoglicerato mutasa** cataliza un desplazamiento reversible del grupo fosforilo entre C-2 y C-3 del glicerato. El Mg^{2+} es esencial para esta reacción:



3-Fosfoglicerato — 2-Fosfoglicerato

$$\Delta G'^\circ = 4{,}4 \text{ kJ/mol}$$

La reacción tiene lugar en dos pasos **(Fig. 14–8)**. Un grupo fosforilo inicialmente unido a un residuo His de la mutasa es transferido al grupo hidroxilo en C-2 del 3-fosfoglicerato, formando 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Se transfiere a continuación el grupo fosforilo en C-3 del 2,3-BPG al mismo residuo His del enzima, produciendo 2-fosfoglicerato y regenerando el enzima fosforilado. La fosfoglicerato mutasa es inicialmente fosforilada

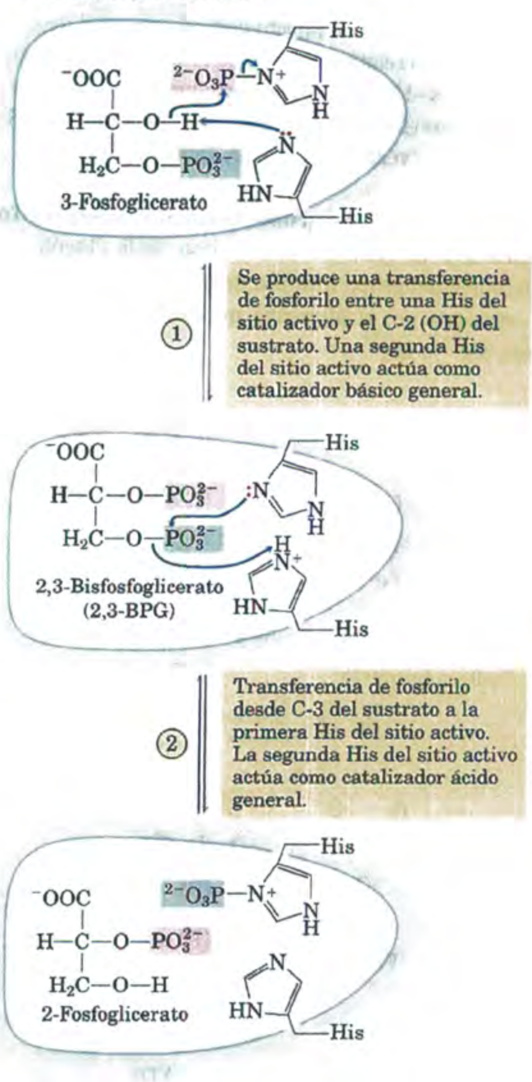
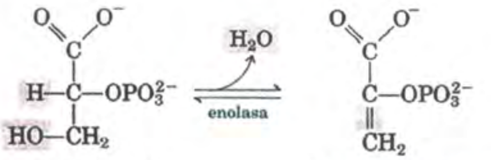


FIGURA 14–8 Reacción de la fosfoglicerato mutasa.

por transferencia de fosforilo desde el 2,3-BPG, que es necesario en pequeñas cantidades para iniciar el ciclo catalítico y es continuamente regenerado por ese ciclo.

⑨ Deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato En la segunda reacción glucolítica que genera un compuesto con potencial elevado de transferencia del grupo fosforilo (la primera fue el paso ⑥), la **enolasa** promueve la eliminación reversible de una molécula de agua del 2-fosfoglicerato, dando **fosfoenolpiruvato (PEP)**:

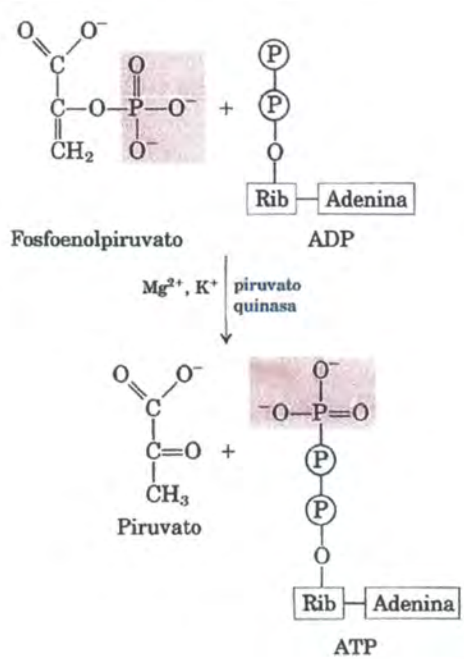


2-Fosfoglicerato **Fosfoenolpiruvato**

$\Delta G'^{\circ} = 7{,}5$ **kJ/mol**

El mecanismo de la reacción de la enolasa implica un intermedio enólico estabilizado por Mg^{2+} (véase la Figura 6–23). La reacción convierte un compuesto con un potencial de transferencia de fosforilo relativamente bajo ($\Delta G'^{\circ}$ de hidrólisis del 2-fosfoglicerato es –17,6 kJ/mol) en uno con un potencial de transferencia de grupo fosforilo muy alto ($\Delta G'^{\circ}$ de hidrólisis del PEP es –61,9 kJ/mol) (véanse Fig. 13–13, Tabla 13–6).

⑩ Transferencia del grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato al ADP El último paso de la glucólisis es la transferencia del grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato al ADP catalizada por la **piruvato quinasa,** que requiere K^+ y también Mg^{2+} o Mn^{2+}:



$\Delta G'^{\circ} = -31{,}4$ **kJ/mol**

En esta fosforilación a nivel de sustrato, el producto **piruvato** aparece en primer lugar en su forma enol y a continuación se tautomeriza rápidamente y de forma no enzimática para dar la forma ceto, que es la que predomina a pH 7:

Piruvato (forma enol) **Piruvato (forma ceto)**

La reacción global tiene una variación de energía libre estándar negativa y grande, debido en gran medida a la conversión espontánea de la forma enol del piruvato en la forma ceto (véase la Fig. 13–13). Alrededor de la mitad de la energía liberada por la hidrólisis del PEP ($\Delta G'^{\circ} = -61{,}9$ kJ/mol) se conserva en la formación del enlace fosfoanhídrido del ATP ($\Delta G'^{\circ} = -30{,}5$ kJ/mol), constituyendo el resto (–31,4 kJ/mol) una gran fuerza propulsora que empuja la reacción hacia la síntesis de ATP. La regulación de la piruvato quinasa se describe en el Capítulo 15.

El balance global muestra una ganancia neta de ATP

Podemos elaborar ahora un balance de la glucólisis en el que se dé cuenta (1) del destino del esqueleto carbonado de la glucosa, (2) de la entrada de P_i y ADP y producción de ATP, y (3) de la ruta de los electrones en las reacciones de oxidación–reducción. El primer miembro de la ecuación siguiente muestra todas las entradas de ATP, NAD^+, ADP y P_i (consulte la Fig. 14–2), mientras que el segundo miembro muestra todo lo que se produce (recuerde que la molécula de glucosa da lugar a dos moléculas de piruvato):

$$\text{Glucosa} + 2\text{ATP} + 2\text{NAD}^+ + 4\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{ADP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 4\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Si simplificamos los términos que son comunes a ambos lados de la ecuación, obtenemos la ecuación global de la glucólisis en condiciones aeróbicas:

$$\text{Glucosa} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Las dos moléculas de NADH formadas durante la glucólisis en el citosol son, en condiciones aeróbicas, reoxidadas a NAD^+ por transferencia de sus electrones a la cadena respiratoria que, en las células eucarióticas, está localizada en la mitocondria. La cadena de transporte electrónico pasa estos electrones a su destino final, el O_2:

$$2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$$

La transferencia de electrones desde el NADH al O_2 en la mitocondria aporta la energía para la biosíntesis de ATP por fosforilación acoplada a la respiración (Capítulo 19).

En el proceso glucolítico global, se convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato (ruta del carbono). Dos moléculas de ADP y dos de P_i se convierten en dos molécu-

las de ATP (ruta de los grupos fosforilo). Finalmente, cuatro electrones, en forma de dos iones hidruro, se transfieren desde dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato a dos de NAD^+ (ruta de los electrones).

La glucólisis está sometida a una regulación estricta

Durante sus estudios sobre la fermentación de la glucosa por la levadura, Louis Pasteur descubrió que tanto la velocidad como la cantidad total de glucosa consumida eran mucho mayores en condiciones anaeróbicas que en condiciones aeróbicas. Estudios posteriores en el músculo pusieron de manifiesto la misma gran diferencia en la velocidad de la glucólisis en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La base bioquímica de este "efecto Pasteur" está clara ahora. El rendimiento en ATP de la glucólisis en condiciones anaeróbicas (2 ATP por molécula de glucosa) es mucho menor que el de la oxidación completa de la glucosa a CO_2 en condiciones aeróbicas (30 o 32 ATP por molécula de glucosa; véase la Tabla 19–5). Para conseguir la misma cantidad de ATP se ha de consumir unas 15 veces más glucosa en condiciones anaeróbicas que en condiciones aeróbicas.

El flujo de glucosa a través de la ruta glucolítica está regulado con el objetivo de conseguir niveles casi constantes de ATP (así como el suministro adecuado de intermediarios glucolíticos que se necesitan para procesos biosintéticos). El ajuste necesario de la velocidad de glucólisis se consigue mediante una compleja influencia recíproca entre consumo de ATP, regeneración de NADH y regulación alostérica de varios enzimas glucolíticos, entre ellos hexoquinasa, PFK-1 y piruvato quinasa, así como por fluctuaciones segundo a segundo de la concentración de metabolitos clave que reflejan el equilibrio celular entre la producción y el consumo de ATP. En una escala de tiempo ligeramente más larga, la glucólisis está regulada por las hormonas glucagón, adrenalina e insulina, así como por cambios en la expresión de los genes de varios enzimas glucolíticos. El cáncer constituye un caso de gran interés en el que la glucólisis experimenta una regulación anormal. El bioquímico alemán Otto Warburg fue el primero en observar, ya en 1928, que prácticamente cualquier tipo de tumor tienen una glucólisis que funciona a una velocidad mucho mayor que en los otros tejidos *incluso con un buen suministro de oxígeno*. Este "efecto Warburg" es la base de diversos métodos de detección y tratamiento del cáncer (Recuadro 14–1).

Warburg, considerado por muchos como el bioquímico más preeminente de la primera mitad del siglo XX, aportó contribuciones básicas a muchas áreas de la bioquímica tales como la respiración, la fotosíntesis y la enzimología del metabolismo intermediario. En el año 1930 Warburg y colaboradores empezaron la purificación y cristalización de siete de los enzimas de la glucólisis. Desarrollaron una herramienta experimental que revolucionó los estudios bioquímicos del metabolismo oxidativo: el manómetro de Warburg, que medía directamente el consumo de oxígeno de los tejidos siguiendo los cambios en el volumen de gas y permitiendo así la medida cuantitativa de cualquier enzima con actividad oxidasa.

Otto Warburg, 1883–1970

Formado en la química de los glúcidos en el laboratorio del gran Emil Fischer (que obtuvo el Premio Nobel de Química en 1902), el mismo Warburg obtuvo el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1931. Diversos estudiantes y colegas de Warburg también fueron premiados con el Premio Nobel: Otto Meyerhof en 1922, Hans Krebs y Fritz Lipmann en 1953 y Hugo Theorell en 1955. El laboratorio de Meyerhof formó a Lipmann y a otros galardonados con el Premio Nobel, como Severo Ochoa (1959), André Lwoff (1965) y George Wald (1967).

La captación de glucosa es deficiente en la diabetes mellitus tipo 1

El metabolismo de la glucosa en los mamíferos está limitado por la velocidad de captación de glucosa por las células y su fosforilación por la hexoquinasa. En la captación de glucosa de la sangre interviene la familia de transportadores de glucosa GLUT (véase la Tabla 11–3). Los transportadores de los hepatocitos (GLUT1, GLUT2) y de las neuronas cerebrales (GLUT3) siempre están presentes en la membrana plasmática. Por el contrario, el principal transportador de glucosa en las células del músculo esquelético, músculo cardíaco y tejido adiposo (GLUT4) está secuestrado en pequeñas vesículas intracelulares y se desplaza a la membrana plasmática sólo en respuesta a una señal de insulina **(Fig. 14–9)**. Ya discutimos este mecanismo de señalización de la insulina en el Capítulo 12 (véase la Fig. 12–16). Así, en el músculo esquelético, corazón y tejido adiposo, la captación y metabolismo de la glucosa depende de la liberación normal de insulina por las células β pancreáticas en respuesta a niveles elevados de glucosa sanguínea (véase la Fig. 23–27).

Los individuos con diabetes mellitus tipo 1 (también denominada diabetes dependiente de insulina) tienen demasiadas pocas células β, con lo que no pueden liberar suficiente insulina para provocar la captación de glucosa por las células del músculo esquelético, corazón o tejido adiposo. Así, después de una comida rica en glúcidos la glucosa se acumula hasta niveles anormalmente elevados en la sangre, condición conocida como hiperglucemia. Incapaz de captar la glucosa, el músculo y el tejido graso utilizan los ácidos grasos de los triacilgliceroles almacenados como combustible principal. En el hígado, el acetil-CoA procedente de esta degradación de los ácidos grasos se convierte en "cuerpos cetónicos" (acetoacetato y β-hidroxibutirato) que se exportan a otros tejidos para su utilización como combustibles (Capítulo 17).

Estos compuestos son de gran importancia para el cerebro, que utiliza los cuerpos cetónicos como combustible alternativo cuando no hay glucosa a su disposición. (Los ácidos grasos no pueden pasar a través de la barrera hematoencefálica, por lo que no pueden utilizarse como combustible por las neuronas cerebrales.)

En la diabetes tipo 1 sin tratar, la sobreproducción de acetoacetato y de β-hidroxibutirato conduce a su acumulación en la sangre, y el consiguiente descenso del pH sanguíneo produce **cetoacidosis,** una situación que pone en peligro la vida. La inyección de insulina permite invertir esta secuencia de acontecimientos: GLUT4 se desplaza a las membranas plasmáticas de

RECUADRO 14–1 MEDICINA La alta velocidad de la glucólisis en los tumores sugiere dianas para la quimioterapia y facilita el diagnóstico

En muchos tipos de tumores encontrados en el ser humano y en otros animales, la captación de glucosa y la glucólisis tienen lugar unas 10 veces más rápidamente que en los tejidos no cancerosos normales. La mayoría de células tumorales crecen en condiciones hipóxicas (es decir, con un suministro limitado de oxígeno) porque, al menos inicialmente, carecen de la red de capilares para el suministro suficiente de oxígeno. Las células cancerosas que están localizadas a más de 100 a 200 μm de los capilares más próximos han de depender exclusivamente de la glucólisis (sin posterior oxidación a piruvato) para la mayor parte de su producción de ATP. El rendimiento energético (2 ATP por glucosa) es mucho más bajo que el obtenido por la oxidación completa del piruvato a CO_2 en las mitocondrias (alrededor de 30 ATP por glucosa; Capítulo 19). Así, para producir la misma cantidad de ATP, las células tumorales han de captar mucha más glucosa que las células normales, convirtiéndola en piruvato y a continuación en lactato a medida que reciclan el NADH. Es probable que dos pasos tempranos en la transformación de una célula normal en tumoral sean (1) el cambio a una dependencia de la glucólisis para la producción de ATP y (2) el desarrollo de una tolerancia al bajo pH en el fluido extracelular (debido a la liberación del producto final de la glucólisis, el ácido láctico). En general, cuanto más agresivo es el tumor, mayor es la velocidad de la glucólisis.

Este aumento de la glucólisis se consigue, al menos en parte, por un aumento de la síntesis de los enzimas glucolíticos y de los transportadores de la membrana plasmática GLUT1 y GLUT3 (véase la Tabla 11–3) que transportan glucosa al interior de las células. (Recuerde que GLUT1 y GLUT3 no dependen de la insulina.) El **factor de transcripción inducible por la hipoxia (HIF-1)** es una proteína que actúa a nivel de la síntesis de mRNA para estimular la producción de al menos ocho enzimas glucolíticos y los transportadores de glucosa cuando el suministro de oxígeno es limitado (Fig. 1). Con la alta velocidad de glucólisis resultante, la célula tumoral puede sobrevivir en condiciones anaeróbicas hasta que el suministro de vasos sanguíneos es adecuado al crecimiento del tumor. Otra proteína inducida por HIF-1 es la hormona peptídica VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), que estimula el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) hacia el tumor.

También existen pruebas de que la proteína supresora de tumores p53, que está mutada en muchos tipos de cáncer (p. 477), controla la síntesis y ensamblaje de proteínas mitocondriales esenciales para el paso de electrones al O_2. Las células con p53 mutante presentan defectos en el transporte electrónico mitocondrial, por lo que están forzadas a depender más fuertemente de la glucólisis para la producción de ATP (Fig. 1).

Esta mayor dependencia de los tumores, en comparación con el tejido normal, respecto a la glucólisis sugiere una posibilidad de terapia anticancerosa: los inhibidores de la glucólisis podrían seleccionar y matar tumores al eliminar su suministro de ATP. Tres inhibidores de la hexoquinasa parecen prometedores como agentes quimioterápicos: 2-desoxiglucosa, lonidamina y 3-bromopiruvato. Al inhibir la formación de glucosa 6-fosfato, estos compuestos no sólo privan a las células tumorales del ATP producido por glucólisis, sino que también impiden

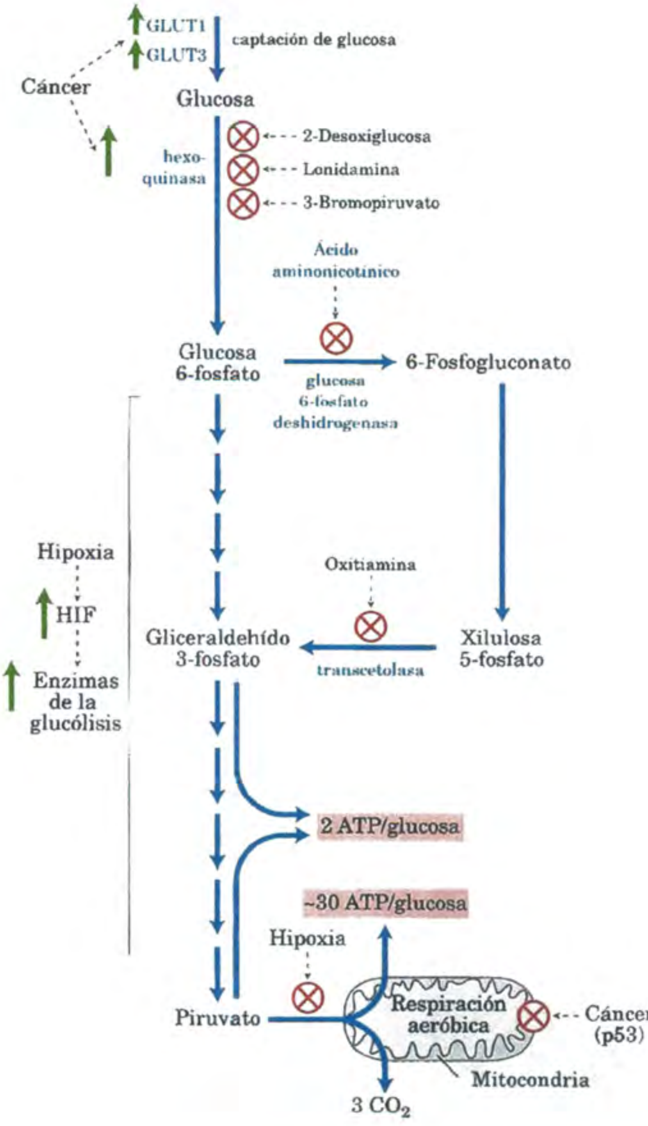


FIGURA 1 El metabolismo anaeróbico de la glucosa en las células tumorales produce mucho menos ATP (2 por glucosa) que la oxidación completa a CO_2 que tiene lugar en las células sanas en condiciones aeróbicas (~30 ATP por glucosa), con lo que una célula tumoral consume mucha más glucosa para producir la misma cantidad de ATP. En los tumores hay una sobreproducción de los transportadores de glucosa y de la mayoría de enzimas glucolíticos. Los compuestos que inhiben la hexoquinasa, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o la transcetolasa bloquean la producción de ATP por la glucólisis, privando así de energía a la célula cancerosa y matándola.

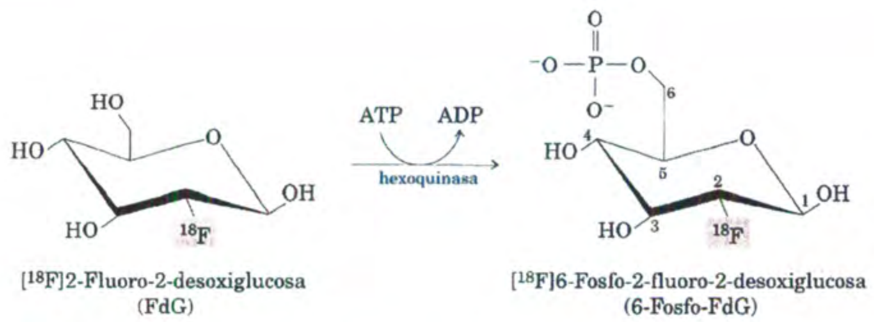


FIGURA 2 La fosforilación de 2-fluoro-2-desoxiglucosa marcada con ^{18}F por la hexoquinasa atrapa el FdG en las células (en forma de 6-fosfo-FdG), en donde su presencia se puede detectar por la emisión de positrones del ^{18}F.

la formación de pentosas fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato, la cual también se inicia con glucosa 6-fosfato. Sin pentosas fosfato una célula no puede sintetizar los nucleótidos esenciales para la síntesis de DNA y RNA y así no puede crecer o dividirse. Otro medicamento anticanceroso ya aprobado para su utilización clínica es el imatinib (Gleevec), descrito en el Recuadro 12–5. Inhibe una tirosina quinasa específica, impidiendo el aumento de la síntesis de hexoquinasa normalmente desencadenado por aquella quinasa. El análogo de la tiamina, la oxitiamina, que bloquea la acción de un enzima tipo transcetolasa que convierte la xilulosa 5-fosfato en gliceraldehído 3-fosfato (Fig. 1), se encuentra presente en ensayos preclínicos como fármaco anticanceroso.

La alta velocidad de la glucólisis en las células tumorales tiene también utilidad diagnóstica. Las tasas relativas a las que los tejidos captan la glucosa puede utilizarse en algunos casos para señalar la localización de tumores. En la tomografía por emisión de positrones (PET), se inyecta a los individuos un análogo inocuo de la glucosa marcado isotópicamente que es captado pero no metabolizado por los tejidos. El compuesto marcado es 2-fluoro-desoxiglucosa (FdG), en el que el grupo hidroxilo en el C-2 de la glucosa ha sido sustituido por ^{18}F (Fig. 2). Este compuesto se capta a través de los transportadores GLUT y es un buen sustrato para la hexoquinasa, pero no se puede convertir en el intermedio enediol de la reacción de la fosfohexosa isomerasa (véase la Fig. 14–4) y, por tanto, se acumula como 6-fosfo-FdG. El grado de acumulación depende de la velocidad de captación y fosforilación que, tal como se ha mencionado anteriormente, es típicamente unas 10 o más veces superior en los tumores que en el tejido normal. La desintegración del ^{18}F da positrones (dos por átomo de ^{18}F) que se pueden detectar por una serie de detectores sensibles colocados alrededor del cuerpo, lo que permite la localización precisa del 6-fosfo-FdG acumulado (Fig. 3).

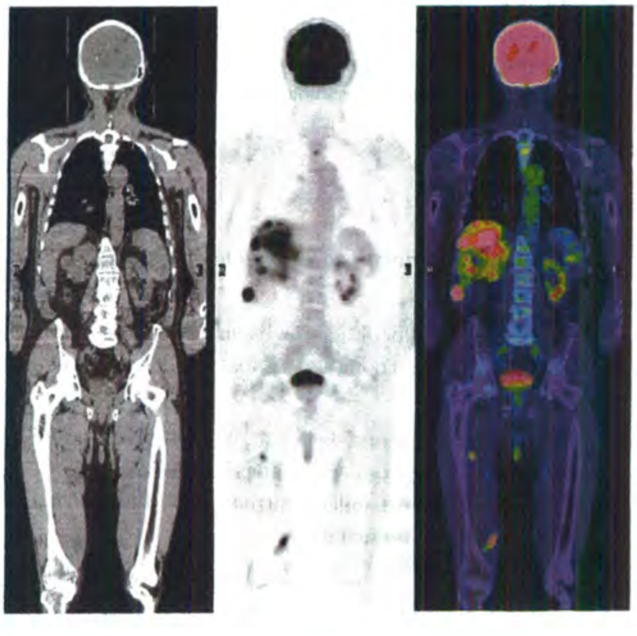


FIGURA 3 Detección de tejido canceroso por tomografía de emisión de positrones (PET). El paciente varón adulto ha sufrido eliminación quirúrgica de un cáncer de piel primario (melanoma maligno). La imagen de la izquierda, obtenida por tomografía computarizada de todo el cuerpo (escán CT), muestra la localización de los tejidos y huesos blandos. El panel central es un escán de PET después de que el paciente haya ingerido 2-fluoro-2-desoxiglucosa marcada con ^{18}F (FdG). Las manchas oscuras indican regiones de elevada utilización de glucosa. Como era de esperar, el cerebro y la vejiga están marcados fuertemente (el cerebro porque utiliza la mayor parte de glucosa consumida por el cuerpo y la vejiga porque el 6-fosfo-FdG marcado con ^{18}F se excreta en la orina). Cuando la intensidad de la marca en el escán de PET se traduce en color falso (la intensidad aumenta del verde al amarillo y al rojo) y se superpone la imagen con el escán de CT, la imagen fusionada (derecha) revela cáncer en los huesos de la columna superior, en el hígado y en algunas regiones del músculo, resultado de la propagación cancerosa del melanoma maligno primario.

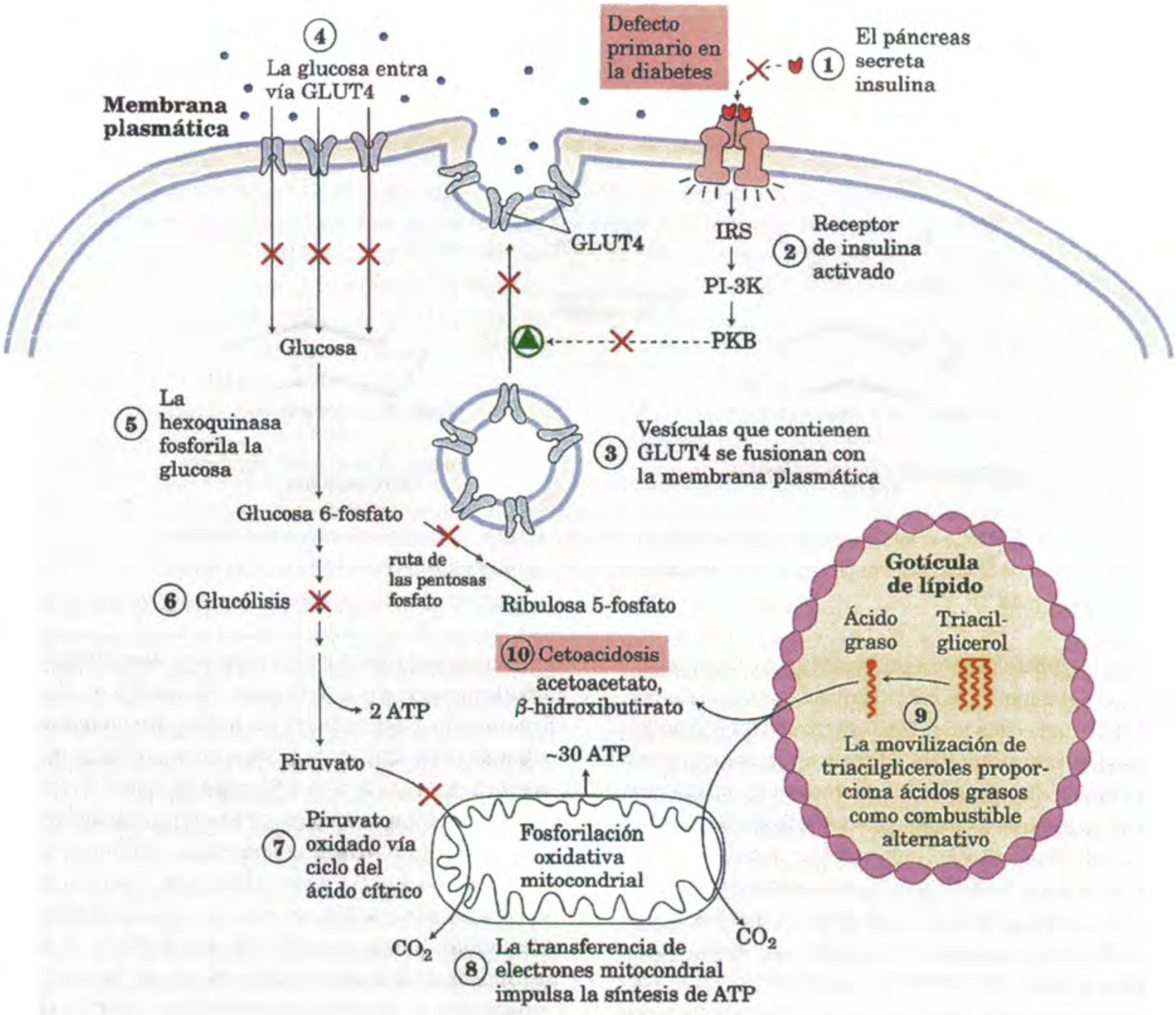


FIGURA 14–9 Efecto de la diabetes tipo 1 sobre el metabolismo de glúcidos y grasas en un adipocito. Normalmente la insulina desencadena la inserción de transportadores GLUT4 en la membrana plasmática por fusión de vesículas que contienen GLUT4 con la membrana, lo que permite la captación de glucosa de la sangre. Cuando disminuyen los niveles sanguíneos de insulina, GLUT4 vuelve a ser secuestrado en vesículas por endocitosis. En la diabetes mellitus tipo 1 (dependiente de insulina) estos procesos normales están inhibidos, lo que se indica con una X. La falta de insulina impide la captación de glucosa vía GLUT4; la consecuencia es que las células se ven privadas de glucosa y la glucosa sanguínea es elevada. Carentes de glucosa para el suministro de energía, los adipocitos degradan triacilgliceroles almacenados en gotículas de grasa y suministran los ácidos grasos resultantes a otros tejidos para la producción mitocondrial de ATP. Se acumulan dos productos colaterales de la oxidación de ácidos grasos en el hígado (acetoacetato y β-hidroxibutirato, véase la p. 666) que se liberan a la sangre, proporcionando combustible para el cerebro pero al mismo tiempo disminuyendo el pH de la sangre, lo que produce cetoacidosis. La misma secuencia de acontecimientos tiene lugar en el músculo, excepto que los miocitos no almacenan triacilgliceroles; por el contrario, captan ácidos grasos liberados por los adipocitos a la sangre.

los adipocitos y hepatocitos, las células captan y fosforilan la glucosa y descienden los niveles de glucosa sanguínea, reduciéndose de este modo la producción de cuerpos cetónicos.

La diabetes mellitus tiene profundos efectos sobre el metabolismo tanto de glúcidos como de grasas. Volveremos a este tema en el Capítulo 23, después de considerar el metabolismo de los lípidos (Capítulos 17 y 21). ■

RESUMEN 14.1 Glucólisis

- La glucólisis es una ruta metabólica casi universal mediante la cual una molécula de glucosa se oxida a dos moléculas de piruvato conservando energía en forma de ATP y NADH.
- Los 10 enzimas glucolíticos se hallan en el citosol, y los 10 intermediarios son compuestos fosforilados de tres o seis carbonos.
- En la fase preparatoria de la glucólisis, se invierte ATP para convertir la glucosa en fructosa 1,6-bisfosfato. A continuación se rompe el enlace entre C-3 y C-4 dando dos moléculas de triosa fosfato.
- En la fase de beneficios cada una de las dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato derivadas de la glucosa se oxidan

en *C-1*; la energía de esta reacción de oxidación se conserva en forma de un NADH y dos ATP por triosa fosfato oxidada. La ecuación neta del proceso global es:

$$\text{Glucosa} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

- La glucólisis está regulada muy fuertemente en coordinación con otras rutas productoras de energía para asegurar un suministro constante de ATP.
- En la diabetes tipo 1, la captación defectuosa de glucosa por los tejidos muscular y adiposo tiene importantes efectos sobre el metabolismo de glúcidos y grasas.

14.2 Rutas alimentadoras de la glucólisis

Un gran número de glúcidos, aparte de la glucosa, entran en último término en la glucólisis, después de ser transformados en uno de los intermediarios glucolíticos. Los más significativos son los polisacáridos de almacenamiento glucógeno y almidón, ya sea de dentro de las células (endógenos) u obtenidos de la dieta; los disacáridos maltosa, lactosa, trehalosa y sacarosa, y los monosacáridos fructosa, manosa y galactosa **(Fig. 14–10)**.

Los polisacáridos y disacáridos de la dieta se hidrolizan a monosacáridos

Para la mayoría de los humanos, el almidón es la principal fuente de glúcidos en la dieta (Fig. 14–10). La digestión comienza en la boca, donde la **α-amilasa** de la saliva hidroliza las uniones glucosídicas internas (α1→4) del almidón, dando lugar a fragmentos cortos de polisacáridos u oligosacáridos. (Observe que en esta reacción de *hidrólisis*, la especie atacante es el agua y no el P_i.)

En el estómago, la α-amilasa de la saliva es inactivada por el pH bajo, pero una segunda forma de α-amilasa, secretada por el páncreas al intestino delgado, continúa el proceso de degradación. La α-amilasa pancreática da lugar principalmente a maltosa y maltotriosa (los di- y trisacáridos de la glucosa) y oligosacáridos llamados dextrinas límite, fragmentos de amilopectina que contienen puntos de ramificación (α1→6). La maltosa y las dextrinas son degradadas a glucosa por enzimas de las microvellosidades intestinales (los microvilli en forma de dedo de las células del epitelio intestinal, que aumentan en gran medida la superficie intestinal). El glucógeno de la dieta tiene básicamente la misma estructura que el almidón y su digestión sigue el mismo proceso.

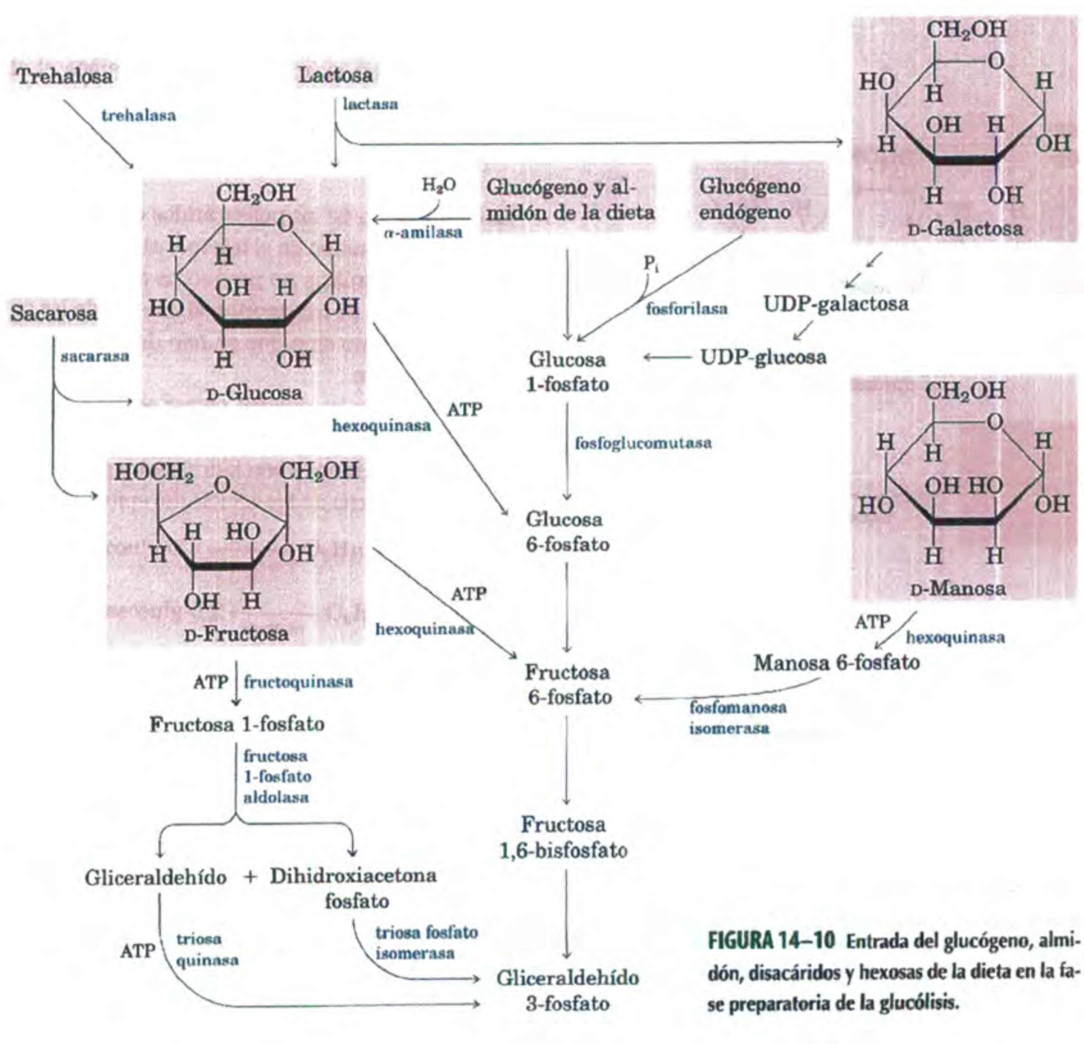


FIGURA 14–10 Entrada del glucógeno, almidón, disacáridos y hexosas de la dieta en la fase preparatoria de la glucólisis.

El glucógeno y el almidón endógenos se degradan mediante fosforólisis

El glucógeno almacenado en los tejidos animales (principalmente el hígado y el músculo esquelético) en microorganismos o en tejidos vegetales se pueden movilizar para su uso dentro de la propia célula mediante una reacción *fosforolítica* catalizada por la **glucógeno fosforilasa (almidón fosforilasa** en los vegetales) **(Fig. 14–11)**. Estos enzimas catalizan un ataque por el P_i sobre el enlace glucosídico (α1→4) que une los dos últimos residuos de glucosa en un extremo no reductor, generando glucosa 1-fosfato y un polímero una unidad de glucosa más corto. En la *fosforólisis* se conserva parte de la energía del enlace glucosídico en el éster fosfato, glucosa 1-fosfato. La glucógeno fosforilasa (o la almidón fosforilasa) actúa repetitivamente hasta que alcanza un punto de ramificación (α1→6) (véase la Fig. 7–14) en el cual se detiene su acción. Un **enzima desramificante** elimina las ramificaciones. Los mecanismos y control de la degradación del glucógeno se describen detalladamente en el Capítulo 15.

La glucosa 1-fosfato, producida por la glucógeno fosforilasa, se convierte en glucosa 6-fosfato por la **fosfoglucomutasa,** que cataliza la reacción reversible

$$\text{Glucosa 1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato}$$

La fosfoglucomutasa utiliza esencialmente el mismo mecanismo que la fosfoglicerato mutasa (p. 537): en ambas se produce un intermedio bisfosfato y el enzima se fosforila transitoriamente en cada ciclo catalítico. El término general **mutasa** se utiliza con los enzimas que catalizan la transferencia de un grupo funcional desde una posición a otra en la misma molécula. Las mutasas son una subclase de las **isomerasas,** enzimas que interconvierten estereoisómeros o isómeros estructurales o posicionales (véase la Tabla 6–3). La glucosa 6-fosfato formada en la reacción de la fosfoglucomutasa puede entrar en la glucólisis o en otra vía tal como la de las pentosas fosfato, descrita en la Sección 14.5.

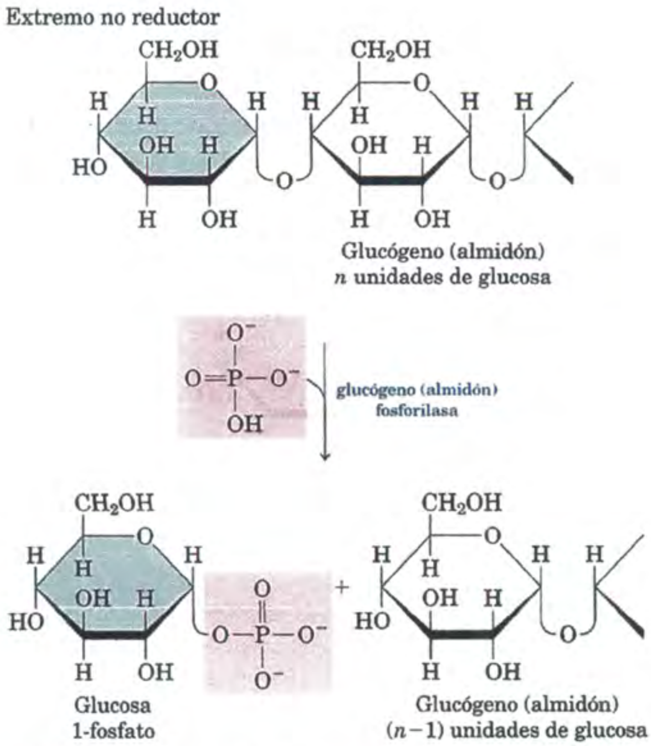


FIGURA 14–11 Degradación del glucógeno intracelular por la glucógeno fosforilasa. El enzima cataliza el ataque por fosfato inorgánico (rosa) sobre el residuo glucosilo terminal (azul) en el extremo no reductor de una molécula de glucógeno, liberando glucosa 1-fosfato y generando una molécula de glucógeno con un residuo de glucosa menos. La reacción es una *fosforólisis* (no hidrólisis).

EJEMPLO PRÁCTICO 14–1 Ahorro de energía en la degradación del glucógeno por fosforólisis

Calcule el ahorro energético (en moléculas de ATP por monómero de glucosa) conseguido en la degradación del glucógeno por *fosforólisis* frente a la *hidrólisis* para empezar el proceso de la glucólisis.

Solución: La fosforólisis produce una glucosa fosforilada (glucosa 1-fosfato), que se convierte a continuación en glucosa 6-fosfato, sin gasto de la energía celular (1 ATP) necesaria para la formación de glucosa 6-fosfato a partir de glucosa libre. Así, sólo se consume 1 ATP por monómero de glucosa en la fase preparatoria, en comparación con los 2 ATP que se consumen cuando la glucólisis comienza con glucosa libre. La célula gana, por tanto, 3 ATP por monómero de glucosa (4 ATP producidos en la fase de beneficios menos 1 ATP utilizado en la fase preparatoria), en lugar de 2, lo que significa el ahorro de 1 ATP por monómero de glucosa.

La degradación de los polisacáridos de la dieta tales como el glucógeno y el almidón en el tracto gastrointestinal por fosforólisis y no por hidrólisis no produciría ahorro energético: los azúcares fosfato no se transportan al interior de las células que recubren el intestino sino que se han de desfosforilar previamente a azúcar libre.

Los disacáridos no pueden entrar en las células sin haber sido previamente hidrolizados a monosacáridos. Los disacáridos y las dextrinas intestinales son hidrolizados por enzimas unidos a la superficie externa de las células del epitelio intestinal:

$$\text{Dextrina} + n\text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{dextrinasa}]{} n\ \text{D-glucosa}$$

$$\text{Maltosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{maltasa}]{} 2\ \text{D-glucosa}$$

$$\text{Lactosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{lactasa}]{} \text{D-galactosa} + \text{D-glucosa}$$

$$\text{Sacarosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{sacarasa}]{} \text{D-fructosa} + \text{D-glucosa}$$

$$\text{Trehalosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{trehalasa}]{} 2\ \text{D-glucosa}$$

Los monosacáridos así formados se transportan activamente al interior de las células epiteliales (véase la Fig. 11–44), desde las cuales pasan a la sangre para ser transportados a diversos tejidos. Allí son fosforilados y canalizados hacia la secuencia glucolítica.

La **intolerancia a la lactosa,** frecuente entre los adultos de la mayoría de razas humanas con excepción de los habitantes del norte de Europa y algunas partes de África, se debe a la desaparición después de la infancia de la mayor parte o de toda la actividad lactasa de las células intestinales. Sin lactasa intestinal la lactosa no puede ser digerida y absorbida completamente en el intestino delgado y pasa al intestino grueso, donde es convertida por las bacterias en productos tóxicos que causan espasmos abdominales y diarrea. El problema se complica aún más porque la lactosa no digerida y sus metabolitos aumentan la osmolaridad del contenido del intestino, lo que favorece la retención de agua en el intestino. En muchas partes del mundo en las que la intolerancia a la lactosa es frecuente, los adultos dejan de ingerir leche como alimento, aunque se pueden encontrar comercialmente en algunos países productos lácteos digeridos con lactasa. En ciertas enfermedades humanas faltan todas o gran parte de las disacaridasas intestinales. En estos casos a veces se alivian los problemas digestivos desencadenados por los disacáridos intestinales mediante una dieta controlada. ■

Otros monosacáridos pueden entrar en diferentes puntos de la ruta glucolítica

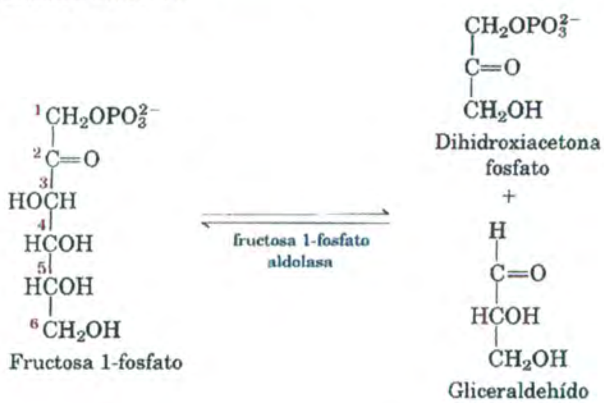
En la mayoría de organismos otras hexosas aparte de la glucosa pueden entrar en la glucólisis después de ser transformadas en un derivado fosforilado. La D-fructosa, presente en su forma libre en muchas frutas y formada en la hidrólisis de la sacarosa en el intestino delgado de los vertebrados, puede ser fosforilada por la hexoquinasa:

$$\text{Fructosa} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{fructosa 6-fosfato} + \text{ADP}$$

En los músculos y riñón ésta es una ruta importante de entrada de la fructosa en la glucólisis. En el hígado, la fructosa entra por una ruta diferente. El enzima hepático **fructoquinasa** cataliza la fosforilación de la fructosa, no en el C-6 sino en el C-1:

$$\text{Fructosa} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{fructosa 1-fosfato} + \text{ADP}$$

La fructosa 1-fosfato se rompe a continuación, formando gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato por la **fructosa 1-fosfato aldolasa:**



La dihidroxiacetona fosfato se convierte en gliceraldehído 3-fosfato por el enzima glucolítico triosa fosfato isomerasa. El gliceraldehído es fosforilado por el ATP y la **triosa quinasa** a gliceraldehído 3-fosfato:

$$\text{Gliceraldehído} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{gliceraldehído 3-fosfato} + \text{ADP}$$

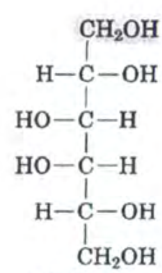
De este modo los dos productos de la hidrólisis de la fructosa 1-fosfato entran en la vía glucolítica en forma de gliceraldehído 3-fosfato.

La D-galactosa, un producto de la hidrólisis del disacárido lactosa (azúcar de la leche), pasa por la sangre del intestino al hígado donde se fosforila primeramente en C-1 a expensas del ATP por la acción del enzima **galactoquinasa:**

$$\text{Galactosa} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{galactosa 1-fosfato} + \text{ADP}$$

La galactosa 1-fosfato se convierte seguidamente en su epímero en C-4, glucosa 1-fosfato, mediante un conjunto de reacciones en las que la **uridina difosfato** (UDP) funciona como un transportador de tipo coenzimático de grupos hexosa **(Fig. 14–12)**. La epimerización implica primero la oxidación del grupo —OH en C-4 a una cetona y a continuación la reducción de la cetona a un —OH con inversión de la configuración en C-4. El NAD es el cofactor tanto para la oxidación como para la reducción.

Defectos en cualquiera de los tres enzimas produce **galactosemia** en los humanos. En la galactosemia por deficiencia de galactoquinasa, se encuentran concentraciones elevadas de galactosa en la sangre y en la orina. Los recién nacidos desarrollan cataratas debido al depósito de galactitol, un metabolito de la galactosa, en el cristalino.



D-Galactitol

Los demás síntomas en esta enfermedad son relativamente benignos y una limitación estricta de la galactosa en la dieta disminuye notablemente su gravedad.

La galactosemia debida a déficit de transferasa es más grave; se caracteriza por poco crecimiento en los niños, anomalías del habla, deficiencia mental y lesión hepática que puede llegar a ser fatal, incluso cuando se suprime la galactosa de la dieta. La galactosemia debida a déficit de epimerasa conduce a síntomas similares pero es menos grave cuando se controla cuidadosamente la galactosa de la dieta. ■

La D–manosa, liberada de la digestión de diversos polisacáridos y glucoproteínas presentes en el alimento puede ser fosforilada en C-6 hexoquinasa:

$$\text{Manosa} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{manosa 6-fosfato} + \text{ADP}$$

La manosa 6-fosfato se isomeriza por la acción de la **fosfomanosa isomerasa,** dando fructosa 6-fosfato, un intermediario de la glucólisis.

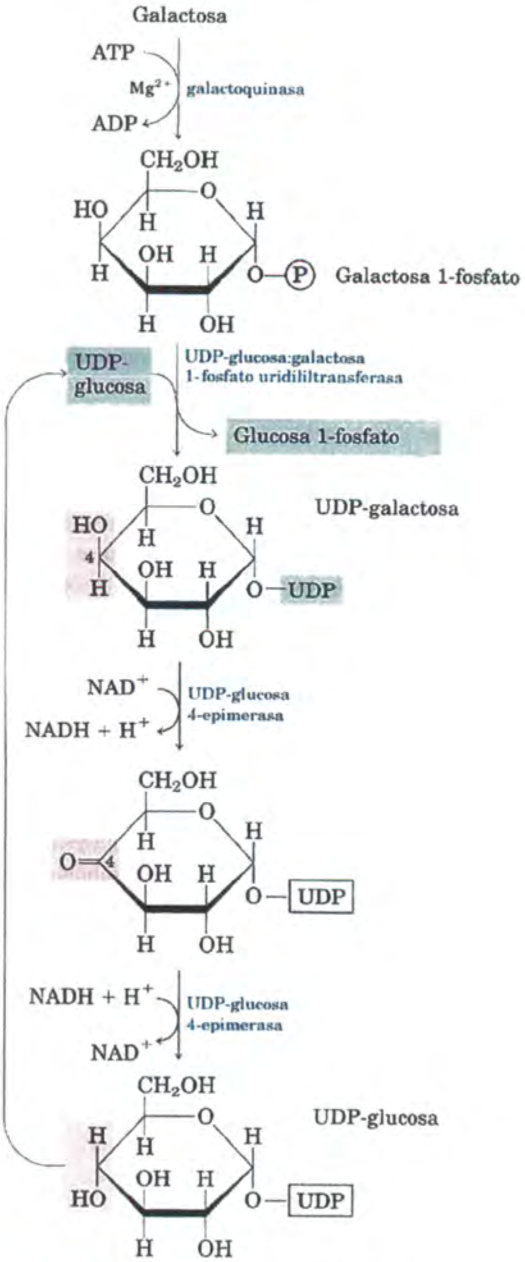


FIGURA 14–12 Conversión de la galactosa en glucosa 1-fosfato. La conversión transcurre a través de un derivado azúcar-nucleótido, UDP-galactosa, que se forma cuando la galactosa-1-fosfato desplaza la glucosa 1-fosfato de la UDP-glucosa. La UDP-galactosa se convierte seguidamente en UDP-glucosa por la UDP-glucosa 4-epimerasa en una reacción que implica la oxidación del C-4 (rosa) por el NAD^+ y a continuación la reducción del C-4 por el NADH; el resultado de estas reacciones es la inversión de la configuración de C-4. La UDP-glucosa se recicla a través de otra vuelta de la misma reacción. El efecto neto de este ciclo es la conversión de la galactosa 1-fosfato en glucosa 1-fosfato; no hay producción o consumo neto de UDP-galactosa o UDP-glucosa.

RESUMEN 14.2 Rutas alimentadoras de la glucólisis

- El glucógeno y el almidón endógenos, las formas de almacenamiento de la glucosa, entran en la glucólisis en un proceso de dos pasos. La rotura fosforolítica de un residuo de glucosa de un extremo del polímero que forma glucosa 1-fosfato es catalizada por la glucógeno fosforilasa o la almidón fosforilasa. A continuación la fosfoglucomutasa convierte la glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato, que puede entrar en la glucólisis.
- Los polisacáridos y disacáridos ingeridos se convierten en monosacáridos por acción de enzimas hidrolíticos del intestino y, a continuación, los monosacáridos entran en las células intestinales y se transportan al hígado o a otros tejidos.
- Diversas D-hexosas, entre ellas la fructosa, la galactosa y la manosa, se pueden canalizar hacia la glucólisis. Cada una es fosforilada y a continuación se convierte en glucosa 6-fosfato, en fructosa 6-fosfato o en fructosa 1-fosfato.
- La conversión de galactosa 1-fosfato en glucosa 1-fosfato se hace a través de dos intermediarios que son derivados de nucleótidos: UDP-galactosa y UDP-glucosa. Defectos genéticos en cualquiera de los tres enzimas que catalizan la conversión de galactosa en glucosa 1-fosfato son causa de galactosemias de gravedad variable.

14.3 Destinos del piruvato en condiciones anaeróbicas: fermentación

En condiciones aeróbicas el piruvato formado en el último paso de la glucólisis se oxida a acetato (acetil-CoA), el cual entra en el ciclo del ácido cítrico y se oxida a CO_2 y H_2O. El NADH formado por la deshidrogenación del gliceraldehído 3-fosfato se reoxida finalmente a NAD^+ mediante el paso final de sus electrones al O_2 en el proceso de la respiración mitocondrial.

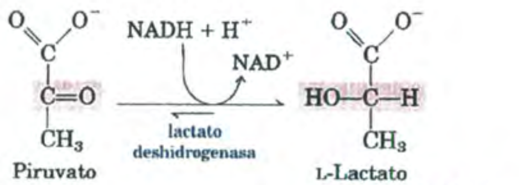
No obstante, en condiciones de hipoxia (baja concentración de oxígeno), como en los músculos esqueléticos muy activos, en las plantas sumergidas o en las bacterias del ácido láctico, el NADH generado en la glucólisis no puede ser reoxidado por el O_2. La incapacidad para regenerar NAD^+ dejaría a la célula sin aceptor de electrones para la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato, con lo que se detendrían las reacciones de la glucólisis que producen energía. Por tanto, se ha de regenerar el NAD^+ mediante otra reacción.

Las primeras células vivieron en una atmósfera casi sin oxígeno, por lo que tuvieron que desarrollar estrategias para obtener energía a partir de moléculas de combustible en condiciones anaeróbicas. La mayoría de los organismos modernos han mantenido la capacidad de regenerar continuamente el NAD^+ durante la glucólisis anaeróbica por medio de la transferencia de los electrones desde el NADH para formar un producto final reducido tal como el lactato o el etanol.

El piruvato es el aceptor electrónico terminal en la fermentación láctica

Cuando a los tejidos animales no se les puede suministrar oxígeno suficiente para mantener la oxidación aeróbica del piruvato y del NADH producidos en la glucólisis, el NAD^+ se regenera a partir del NADH mediante la reducción del piruvato a **lactato.** Tal como ya se ha mencionado anteriormente, ciertos tejidos y

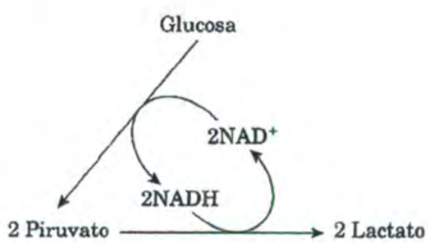
tipos celulares (tales como los eritrocitos que no tienen mitocondrias y, por tanto, no pueden oxidar el piruvato a CO_2) producen lactato a partir de la glucosa en condiciones aeróbicas. La reducción del piruvato en esta ruta está catalizada por la **lactato deshidrogenasa,** que forma el isómero L del lactato a pH 7:



$\Delta G'^\circ = -25{,}1$ kJ/mol

El equilibrio global de esta reacción favorece fuertemente la formación de lactato, tal como se demuestra por la gran variación negativa de la energía libre estándar.

En la glucólisis la deshidrogenación de las dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato procedentes de cada molécula de glucosa transforma dos moléculas de NAD^+ en dos de NADH. Debido a que la reducción de dos moléculas de piruvato a dos de lactato regenera dos moléculas de NAD^+, no hay cambio neto de NAD^+ o de NADH:

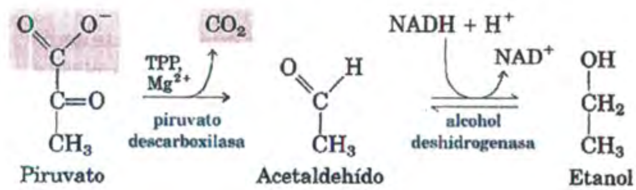


El lactato formado por músculos esqueléticos activos (o por eritrocitos) puede reciclarse; se transporta por la sangre al hígado, en donde se convierte en glucosa durante la recuperación de la actividad muscular vigorosa. Cuando se produce lactato en grandes cantidades durante la contracción muscular vigorosa (durante un sprint, por ejemplo), la acidificación resultante de la ionización del ácido láctico en el músculo y en la sangre limita los períodos de actividad enérgica. Los atletas mejor preparados no pueden esprintar a velocidad límite durante más de un minuto (Recuadro 14–2).

Aunque hay dos pasos de oxidación-reducción en la conversión de la glucosa en lactato, no hay cambio neto en el estado de oxidación del carbono; en la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y en el ácido láctico ($C_3H_6O_3$), la proporción H:C es la misma. No obstante, se ha extraído parte de la energía de la molécula de glucosa en su conversión a lactato, suficiente para producir un rendimiento neto de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa consumida. **Fermentación** es el término general para este tipo de procesos que extraen energía (en forma de ATP) pero que no consumen oxígeno o cambian las concentraciones de NAD^+ o NADH. Las fermentaciones son debidas a una variedad muy elevada de organismos, muchos de los cuales ocupan nichos anaeróbicos, formando una gran variedad de productos, algunos de los cuales pueden ser utilizados comercialmente.

El etanol es el producto reducido en la fermentación alcohólica

La levadura y otros microorganismos fermentan la glucosa a etanol y CO_2, en lugar de formar lactato. La glucosa se convierte en piruvato durante la glucólisis y el piruvato se transforma en etanol y CO_2 en un proceso de dos pasos.



En el primer paso, el piruvato se descarboxila en una reacción irreversible catalizada por la **piruvato descarboxilasa.** Esta reacción es una descarboxilación simple que no supone la oxidación neta del piruvato. La piruvato descarboxilasa necesita Mg^{2+} y tiene un coenzima unido muy fuertemente, la tiamina pirofosfato, que se describe con mayor detalle más adelante. En el segundo paso, el acetaldehído se reduce a etanol a través de la acción de la **alcohol deshidrogenasa** mediante el poder reductor proporcionado por el NADH procedente de la deshidrogenación del gliceraldehído 3-fosfato. Esta reacción es un caso bien estudiado de transferencia de hidruro a partir del NADH **(Fig. 14–13)**. Por lo tanto, los productos finales de la fermentación alcohólica son el etanol y el CO_2, y la ecuación global es:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{etanol} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Del mismo modo que en la fermentación del ácido láctico, no hay cambio neto en la razón de átomos de hidrógeno a átomos de carbono cuando se fermenta la glucosa, (razón H:C = 12/6 = 2) a dos etanol y dos CO_2 (razón combinada H:C = 12/6 = 2).

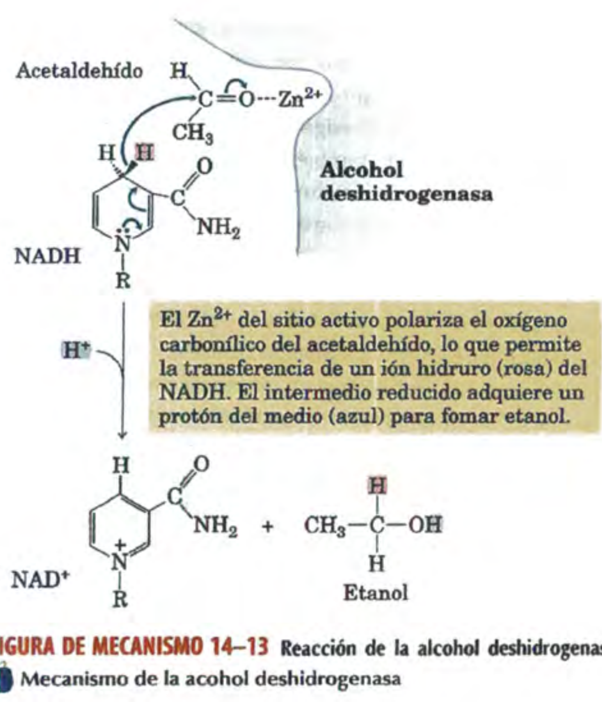


FIGURA DE MECANISMO 14–13 Reacción de la alcohol deshidrogenasa.
Mecanismo de la acohol deshidrogenasa

En todas las fermentaciones la razón H:C de los reactivos y los productos permanece inalterada.

La piruvato descarboxilasa se encuentra en las levaduras de cerveza y de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*), y en todos los organismos que dan lugar a la fermentación alcohólica, entre ellos algunas plantas. El CO_2 producido por la descarboxilación del piruvato en la levadura de cerveza es el responsable de la gasificación característica del champán. En el antiguo arte

RECUADRO 14–2 Atletas, caimanes y celacantos: la glucólisis en condiciones limitantes de oxígeno

La mayoría de vertebrados son organismos esencialmente aeróbicos; convierten la glucosa en piruvato mediante la glucólisis y a continuación oxidan el piruvato completamente a CO_2 y H_2O utilizando el oxígeno molecular. El catabolismo anaeróbico de la glucosa a lactato tiene lugar durante cortas acciones de actividad muscular extrema, por ejemplo en un sprint de 100 m, durante el cual no se puede transportar oxígeno al músculo de forma suficientemente rápida para oxidar el piruvato. En su lugar los músculos usan la glucosa almacenada (glucógeno) como combustible para generar ATP por fermentación, con lactato como producto final. En un sprint, el lactato sanguíneo aumenta hasta concentraciones elevadas y vuelve a convertirse lentamente en glucosa por gluconeogénesis en el hígado en el posterior período de descanso o de recuperación. En este período el oxígeno se consume a un ritmo que disminuye gradualmente hasta que la respiración vuelve a ser normal. El exceso de oxígeno consumido durante el período de recuperación representa el pago de la deuda de oxígeno. Ésta es la cantidad de oxígeno que se precisa para suministrar ATP para la gluconeogénesis durante la recuperación de la respiración a fin de regenerar el glucógeno "tomado en préstamo" del hígado y músculo para llevar a cabo la intensa actividad muscular del sprint. El ciclo de reacciones en el que se incluye la conversión de glucosa en lactato en el músculo y la conversión de lactato en glucosa en el hígado se denomina ciclo de Cori, en honor de Carl y Gerty Cori, cuyos estudios en las décadas de 1930 y 1940 clarificaron la ruta y su papel (véase el Recuadro 15–4).

Los sistemas circulatorios de muchos vertebrados pequeños pueden transportar oxígeno a sus músculos con suficiente rapidez para evitar el tener que usar el glucógeno muscular anaeróbicamente. Por ejemplo, las aves migratorias acostumbran a cubrir grandes distancias a alta velocidad sin descanso y sin provocar una deuda de oxígeno. Muchos animales corredores de tamaño moderado también mantienen un metabolismo esencialmente aeróbico en su musculatura esquelética. Pero en los animales grandes, el ser humano, incluido el sistema circulatorio no puede mantener completamente el metabolismo aeróbico de los músculos esqueléticos durante períodos largos de actividad muscular intensa. Estos animales acostumbran a moverse lentamente en circunstancias normales y sólo realizan actividades musculares intensas en las emergencias más graves, dado que tales períodos de fuerte actividad requieren largos períodos de recuperación para cancelar la deuda de oxígeno.

Los caimanes y cocodrilos, por ejemplo, son normalmente animales perezosos y apáticos. No obstante, cuando se les provoca, son capaces de cargas rápidas fulminantes y de peligrosos latigazos con su colas poderosas. Estas explosiones de actividad son cortas y han de ir seguidas de largos períodos de recuperación. Los rápidos movimientos de emergencia requieren fermentación a lactato para generar ATP en los músculos esqueléticos. Los depósitos de glucógeno musculares se gastan rápidamente en la actividad muscular intensa y el lactato alcanza concentraciones muy elevadas en los miocitos y en el fluido extracelular. Mientras que un atleta entrenado puede recuperarse de un sprint de 100 m en 30 minutos o menos, un caimán puede necesitar muchas horas de descanso y consumo extra de oxígeno para eliminar el exceso de lactato de su sangre y regenerar el glucógeno muscular después de una actividad violenta.

Otros animales grandes, tales como los elefantes y los rinocerontes, tienen características metabólicas similares, lo mismo que los buceadores como las ballenas y las focas. Los dinosaurios y otros grandes animales actualmente extinguidos probablemente tenían que depender de la fermentación a lactato para el suministro de energía para la actividad muscular, seguida de períodos de recuperación muy largos en los que eran vulnerables al ataque por depredadores más pequeños pero mejor capacitados para utilizar oxígeno y por lo tanto mejor adaptados a una actividad muscular continua y sostenida.

Las exploraciones marinas en aguas abisales han descubierto muchas especies en las grandes profundidades oceánicas en donde la concentración de oxígeno es casi nula. Por ejemplo, el celacanto primitivo, un gran pez que vive a profundidades de 4.000 m en zonas cercanas a la costa sudafricana, tiene un metabolismo anaeróbico en todos sus tejidos. Convierte glúcidos en lactato y otros productos, la mayoría de los cuales han de ser excretados. Algunos vertebrados marinos fermentan la glucosa a etanol y CO_2 para obtener energía en forma de ATP.

de la producción de cerveza intervienen diversos procesos enzimáticos aparte de las reacciones de la fermentación alcohólica (Recuadro 14–3). En la panificación, el CO_2 liberado por la piruvato descarboxilasa cuando se mezcla la levadura con un azúcar fermentable hace que suba la masa. Este enzima está ausente de los tejidos de los vertebrados y de otros organismos que llevan a cabo la fermentación láctica.

La alcohol deshidrogenasa está presente en muchos organismos que metabolizan etanol, entre ellos el ser humano. En el hígado humano cataliza la oxidación del etanol, ya sea el ingerido o el producido por los microorganismos intestinales con la reducción concomitante del NAD^+ a NADH. En este caso la reacción transcurre en la dirección opuesta a la que se da en la producción de etanol por la fermentación.

La tiamina pirofosfato transporta grupos "acetaldehído activos"

La reacción de la piruvato descarboxilasa representa nuestro primer contacto con la **tiamina pirofosfato**

RECUADRO 14–3 Fermentación alcohólica: elaboración de cerveza y producción de biofuel

La elaboración de la cerveza fue una ciencia que la humanidad emprendió en épocas tempranas y que después refinó para su producción en gran escala. La cerveza se prepara por fermentación etanólica de los glúcidos presentes en los granos (semillas) de cereales tales como la cebada por parte de enzimas glucolíticos de la levadura. Los glúcidos, básicamente polisacáridos, deben ser previamente degradados a di- y monosacáridos. Las semillas de cebada se han de someter primeramente a un proceso denominado malteado. Se deja que las semillas de cereal germinen hasta que forman los enzimas hidrolíticos requeridos para degradar los polisacáridos, momento en el que se detiene la germinación mediante calefacción controlada. El producto es la malta, la cual contiene enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces β de la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular de las cáscaras de cebada, además de enzimas tales como la β-amilasa y la maltasa.

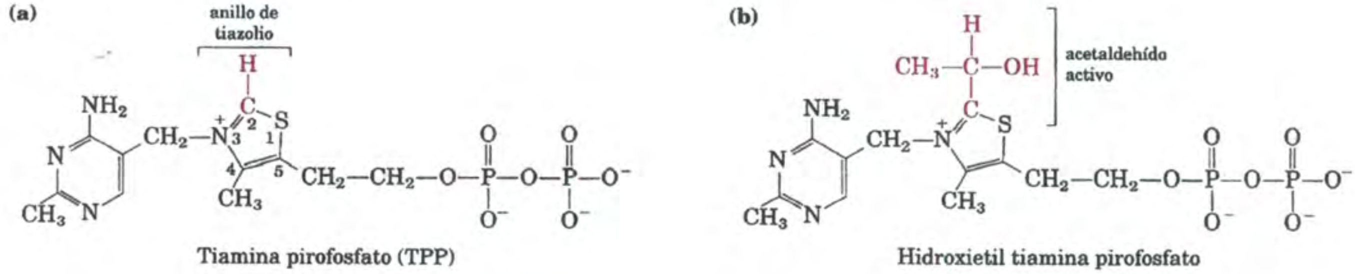
En el siguiente paso el cervecero prepara el mosto, que es el medio nutriente necesario para la posterior fermentación por las células de levadura. La malta se mezcla con agua y se tritura. Esto permite que los enzimas formados durante el proceso de malteado actúen sobre los polisacáridos del cereal formando maltosa, glucosa y otros azúcares sencillos solubles en el medio acuoso. La materia celular restante se separa seguidamente y el líquido se hierve con lúpulo para darle sabor. A continuación el líquido se enfría y se airea.

Se añaden ahora las células de levadura. En el caldo aeróbico las levaduras crecen y se reproducen muy rápidamente, utilizando energía de los azúcares presentes. En esta fase no se forma etanol debido a que la levadura, con amplio suministro de oxígeno, oxida el piruvato formado por la glucólisis a CO_2 y H_2O vía ciclo del ácido cítrico. Cuando se ha consumido todo el oxígeno disuelto del recipiente, las células de levadura pasan a metabolizar el azúcar de forma anaeróbica. A partir de este punto la levadura fermenta los azúcares a etanol y CO_2. El proceso de fermentación viene controlado en parte por la concentración de etanol formado, por el pH y por la cantidad de azúcar restante. Una vez se ha detenido la fermentación, se separan las células y la cerveza "cruda" está lista para el tratamiento final.

En los últimos pasos de la elaboración de la cerveza, se ajusta la cantidad de espuma que proviene de proteínas disueltas. Esto se controla normalmente mediante la acción de enzimas proteolíticos que aparecen en el proceso de malteado. Si estos enzimas actúan durante demasiado tiempo la cerveza formará poca espuma; si no actúan durante un tiempo suficiente la cerveza no será cristalina cuando esté fría. A veces se añaden enzimas proteolíticos de otro origen para controlar la cantidad de espuma.

Gran parte de la tecnología desarrollada para la producción de bebidas alcohólicas a gran escala está encontrando en la actualidad aplicación a un problema totalmente diferente: la producción de etanol como combustible renovable. Con la desaparición continuada de las reservas conocidas de combustibles fósiles y el coste creciente del combustible para los motores de combustión interna, hay un interés cada vez mayor en la utilización del etanol como combustible sustituto o complementario. La ventaja principal del etanol como combustible es que se puede producir de fuentes *baratas* y *renovables* ricas en sacarosa, almidón o celulosa (el almidón del maíz o del trigo, la sacarosa de la remolacha o la caña de azúcar y la celulosa de la paja, desechos e la industria forestal o de residuos sólidos urbanos). Típicamente, la materia prima (material de partida) se convierte primero de forma química en monosacáridos y a continuación se utiliza para alimentar una cepa robusta de levadura en un fermentador a escala industrial (Fig. 1). La fermentación puede producir no sólo etanol para utilizar como combustible sino también productos secundarios tales como proteínas que se pueden utilizar como alimento para animales.

FIGURA 1 Las fermentaciones a escala industrial para producir biocombustible y otros productos se llevan a cabo normalmente en tanques que contienen miles de litros de medio.



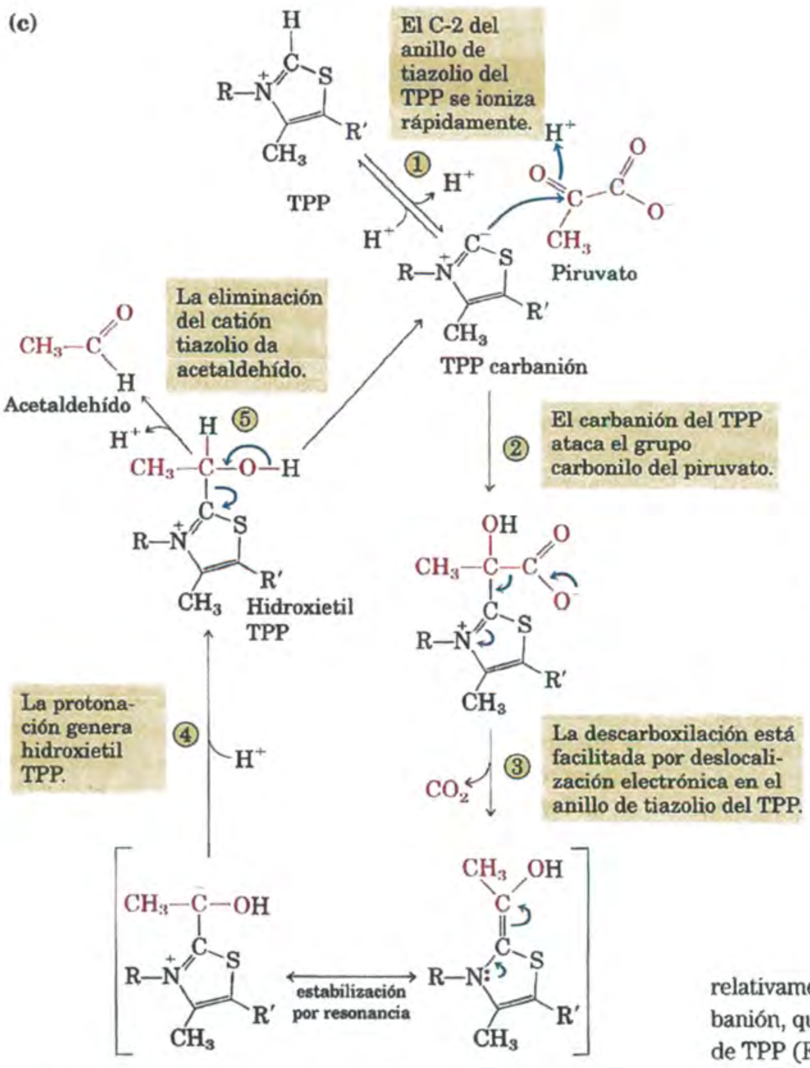


FIGURA DE MECANISMO 14–14 Tiamina pirofosfato (TPP) y su papel en la descarboxilación del piruvato. **(a)** El TPP es la forma coenzimática de la vitamina B_1 (tiamina). El átomo de carbono reactivo en el anillo de tiazolio del TPP se muestra en rojo. En la reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa, se transportan transitoriamente dos de los tres carbonos del piruvato sobre el TPP en forma de grupo hidroxietilo, o " acetaldehído activo" **(b)**, que es liberado a continuación como acetaldehído. **(c)** El anillo de tiazolio del TPP estabiliza los intermedios carbanión al proporcionar una estructura electrofílica (deficiente en electrones) en la que los electrones del carbanión pueden deslocalizarse por resonancia. A las estructuras con estas propiedades se las llama frecuentemente "sumideros de electrones" y juegan un papel en muchas reacciones bioquímicas; en este caso facilita la rotura de un enlace carbono–carbono. **Mecanismos de la tiamina pirofosfato**

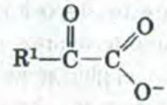
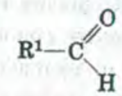
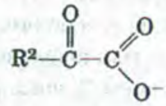
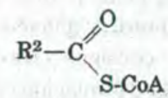
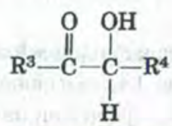
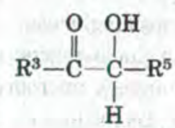
(TPP) (Fig. 14–14), coenzima que proviene de la vitamina B_1. La ausencia de vitamina B_1 en la dieta humana lleva a la enfermedad conocida como beriberi, caracterizada por una acumulación de fluidos corporales (hinchamiento), dolor, parálisis y en último término muerte. ■

La tiamina pirofosfato juega un papel importante en la rotura de enlaces adyacentes a un grupo carbonilo, tales como la descarboxilación de los α-cetoácidos, y en reordenamientos químicos en los que hay transferencia de un grupo aldehído activado desde un átomo de carbono a otro (Tabla 14–1). La parte funcional del TPP, el anillo de tiazolio, tiene un protón en C-2 relativamente ácido. La pérdida de este protón produce un carbanión, que es la especie activa en las reacciones dependientes de TPP (Fig. 14–14). El carbanión se adiciona fácilmente a grupos carbonilo, con lo que el anillo de tiazolio está de este modo en situación para actuar como "sumidero electrónico" que facilita en gran manera reacciones tales como la descarboxilación catalizada por la piruvato descarboxilasa.

Algunas fermentaciones microbianas dan lugar a algunos alimentos comunes y productos industriales

Hace millones de años que nuestros antepasados aprendieron a utilizar las fermentaciones en la producción y conservación de alimentos. Ciertos microorganismos presentes en los productos alimenticios crudos fermentan los glúcidos y dan lugar a productos metabólicos que dan a los alimentos sus formas, texturas y gustos característicos. El yogur ya conocido en los tiempos bíblicos se produce cuando la bacteria *Lactobacillus bulgaricus* fermenta los azúcares de la leche, produciendo ácido láctico; el

TABLA 14–1 Algunas reacciones dependientes de TPP

Enzima	Ruta(s)	Enlace roto	Enlace formado
Piruvato descarboxilasa	Fermentación etanólica		
Piruvato deshidrogenasa α-Cetoglutarato deshidrogenasa	Síntesis de acetil-CoA Ciclo del ácido cítrico		
Transcetolasa	Reacciones de asimilación de carbono Ruta de las pentosas fosfato		

correspondiente descenso de pH hace que precipiten las proteínas de la leche, produciendo la textura espesa y el sabor amargo del yogur sin azucarar. Otra bacteria, y *Propionibacterium freudenreichii* fermenta la leche produciendo ácido propiónico y CO_2; el ácido propiónico precipita las proteínas de la leche y las burbujas de CO_2 dan lugar a los agujeros característicos del queso suizo. Muchos otros productos son el resultado de fermentaciones: escabeche, chucrut, salsichas, salsa de soja y toda una serie de platos nacionales favoritos tales como el kimchi (Corea), tempoyak (Indonesia), kéfir (Rusia), dahi (India) y pozol (México). El descenso del pH asociado con la fermentación también ayuda a conservar los alimentos, porque la mayoría de microorganismos causantes del deterioro de los alimentos no pueden crecer a pH bajo. En la agricultura, productos vegetales secundarios tales como los tallos del maíz se conservan para utilizarlos como alimento animal apilándolos en grandes contenedores (silos) con un acceso de aire limitado; la fermentación microbiana produce ácidos que hacen disminuir el pH. El forraje resultante de esta fermentación se puede guardar como pienso durante largos períodos sin que se deteriore.

En 1910 Chaim Weizmann (que después se convirtió en el primer presidente de Israel) descubrió que una bacteria, *Clostridium acetobutyricum,* fermenta el almidón a butanol y acetona. Este descubrimiento abrió el campo de las fermentaciones industriales, en las que se suministra algún material fácilmente asequible y rico en glúcidos (almidón de maíz o melazas, por ejemplo) a un cultivo puro de un microorganismo específico que lo fermenta, dando un producto de mayor valor comercial. El etanol utilizado para fabricar el "gasohol" se produce por fermentación microbiana, al igual que los ácidos fórmico, acético, propiónico, butírico y succínico, y el glicerol, etanol, isopropanol, butanol y butanodiol. Estas fermentaciones se realizan generalmente en grandes recipientes cerrados en los que se ajusta la temperatura y la entrada de aire para favorecer la multiplicación de los microorganismos deseados al tiempo que se excluyen organismos contaminantes. La belleza de las fermentaciones industriales reside en que complicadas transformaciones químicas de muchos pasos se llevan a término con rendimientos elevados y con pocos productos secundarios por fábricas químicas que se reproducen a sí mismas: las células microbianas. En algunas fermentaciones industriales se ha desarrollado tecnología que permite inmovilizar las células sobre un soporte inerte, pasar la materia prima de manera continua a través del lecho de células inmovilizadas y recoger el producto deseado en el efluente: ¡el sueño de un ingeniero!

RESUMEN 14.3 Destinos del piruvato en condiciones anaeróbicas: fermentación

- El NADH formado en la glucólisis debe reciclarse para regenerar el NAD^+ que se requiere como aceptor electrónico en el primer paso de la fase de beneficios. En condiciones aeróbicas los electrones pasan desde el NADH al O_2 en la respiración mitocondrial.
- En condiciones anaeróbicas o hipóxicas muchos organismos regeneran el NAD^+, transfiriendo los electrones del NADH al piruvato y formando lactato. Otros organismos, tales como la levadura, regeneran el NAD^+ mediante reducción del piruvato a etanol y CO_2. En estos procesos anaeróbicos (fermentaciones), no se produce oxidación o reducción *neta* de los carbonos de la glucosa.
- Una gran variedad de microorganismos pueden fermentar el azúcar de los alimentos frescos, lo que da lugar a cambios de pH, gusto y textura y a la conservación del alimento. Las fermentaciones se utilizan en la industria para producir muchos compuestos orgánicos de valor comercial a partir de materias primas baratas.

14.4 Gluconeogénesis

El papel central de la glucosa apareció tempranamente dentro de la evolución y este azúcar continúa siendo el combustible y bloque estructural casi universal de los organismos modernos, desde los microbios hasta el ser humano. En los mamíferos, algunos tejidos dependen casi por completo de la glucosa para la producción de energía metabólica. Para el cerebro y el sistema nervioso humanos, así como para los eritrocitos, los testículos, la médula renal y los tejidos embrionarios, la glucosa de la

sangre es la única, o principal, fuente de combustible. Sólo el cerebro humano requiere más de 120 g de glucosa al día, más de la mitad de toda la glucosa que se encuentra almacenada como glucógeno en el músculo y en el hígado. Sin embargo, el suministro de glucosa a partir de estos depósitos no siempre es suficiente; entre comidas y durante ayunos prolongados, o después de un ejercicio vigoroso, el glucógeno se ha agotado. Durante estos períodos, los organismos necesitan un método para sintetizar glucosa a partir de precursores no glucídicos. Esto se consigue a través de una ruta denominada **gluconeogénesis** ("formación de azúcar nuevo"), encargada de convertir el piruvato y los compuestos relacionados de tres y cuatro carbonos en glucosa.

La gluconeogénesis tiene lugar en todos los animales, plantas, hongos y microorganismos. Las reacciones son, esencialmente, las mismas en todos los tejidos y en todas las especies.

FIGURA 14–15 Síntesis de glúcidos a partir de precursores sencillos. La ruta desde el fosfoenolpiruvato hasta la glucosa 6-fosfato es común en la conversión biosintética de muchos precursores diferentes de glúcidos tanto en animales como en plantas. La ruta desde el piruvato al fosfoenolpiruvato pasa a través del oxalacetato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico que se discute en el Capítulo 16. Cualquier compuesto que pueda convertirse en piruvato u oxalacetato puede servir, por tanto, como material de partida para la gluconeogénesis. Esto incluye la alanina y el aspartato que se pueden convertir en piruvato y oxalacetato, respectivamente, así como otros aminoácidos que pueden dar lugar a fragmentos con tres o cuatro carbonos, los llamados aminoácidos glucogénicos (Tabla 14–4; véase también la Fig. 18–15). Las plantas y las bacterias fotosintéticas son los únicos organismos capaces de convertir el CO_2 en glúcidos.

Los precursores importantes de la glucosa en los animales son compuestos de tres carbonos tales como lactato, piruvato y glicerol, así como ciertos aminoácidos **(Fig. 14–15)**. En los mamíferos la gluconeogénesis tiene lugar principalmente en el hígado y en menor extensión en la corteza renal y en las células epiteliales que recubren el intestino delgado. La glucosa producida pasa a la sangre para abastecer otros tejidos. Después de un ejercicio vigoroso, el lactato producido por la glucólisis anaeróbica en el músculo esquelético vuelve al hígado y se convierte en glucosa que vuelve de nuevo al músculo y se convierte en glucógeno en un circuito denominado ciclo de Cori (Recuadro 14–2; véase también la Fig. 23–20). En las semillas germinadas de plantas, las grasas y las proteínas almacenadas se convierten, a través de rutas entre las que se encuentra la gluconeogénesis, en el disacárido sacarosa para su transporte a partir de la planta en desarrollo. La glucosa y sus derivados son los precursores en la síntesis de los componentes de las paredes celulares de las plantas, los nucleótidos y los coenzimas, así como de un gran número de metabolitos esenciales. En muchos microorganismos la gluconeogénesis empieza a partir de compuestos orgánicos sencillos tales como acetato, lactato y propionato presentes en su medio de cultivo.

Aunque las reacciones de la gluconeogénesis son las mismas en todos los organismos, el contexto metabólico y la regulación de la vía difieren de un organismo a otro y de tejido a tejido. En esta sección nos fijaremos en la gluconeogénesis tal como tiene lugar en el hígado de los mamíferos. En el Capítulo 20 mostraremos de qué modo utilizan esta vía los organismos fotosintéticos para convertir los productos primarios de la fotosíntesis en glucosa que será almacenada en forma de sacarosa o almidón.

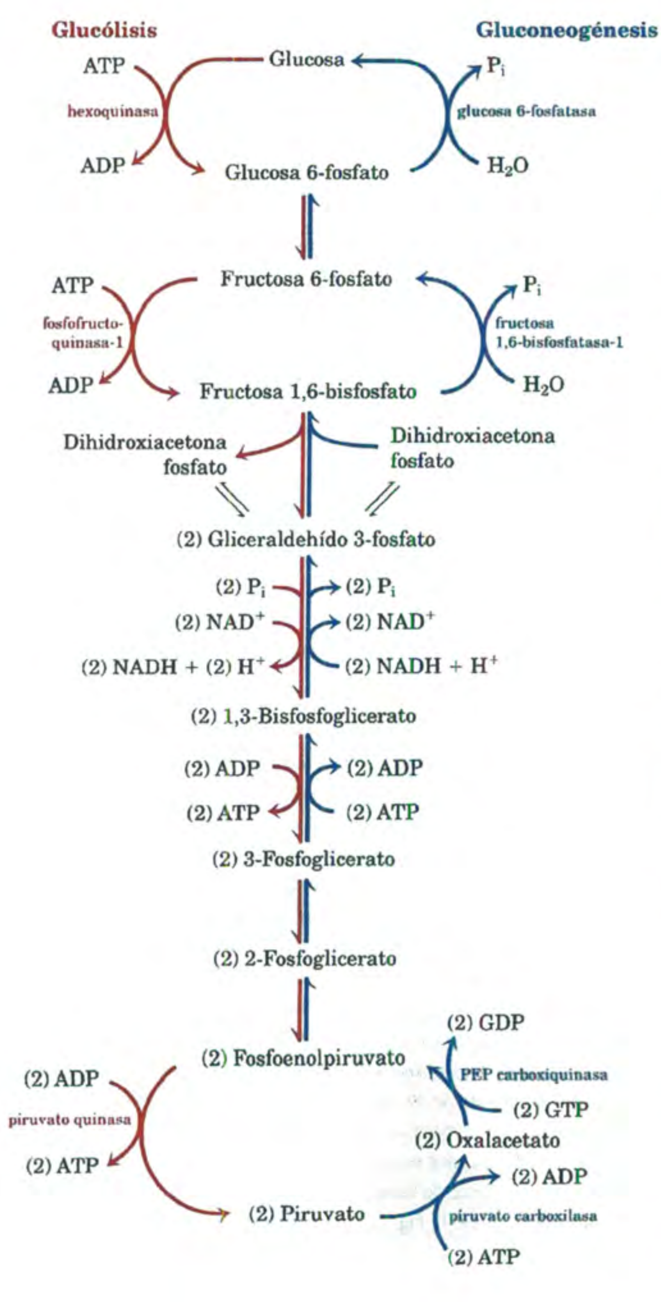
La gluconeogénesis y la glucólisis no son rutas idénticas que transcurren en direcciones opuestas aunque comparten varios pasos **(Fig. 14–16)**; 7 de las 10 reacciones enzimáticas de la gluconeogénesis son la inversa de las reacciones glucolíticas. No obstante, hay tres reacciones de la glucólisis que son prácticamente irreversibles in vivo y que no pueden utilizarse en la gluconeogénesis: la conversión de glucosa en glucosa 6-fosfato por la hexoquinasa, la fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato por la fosfofructoquinasa-1 y la conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato por la piruvato quinasa (Fig. 14–16). En las células, estas tres reacciones se caracterizan por una gran variación negativa de energía libre, mientras que otras reacciones glucolíticas tienen una ΔG próxima a 0 (Tabla 14–2). En la gluconeogénesis, los tres pasos irreversibles se "rodean" mediante un conjunto diferente de enzimas que catalizan reacciones que son suficientemente exergónicas para ser efectivamente irreversibles en la dirección de síntesis de la glucosa. De este modo, tanto la glucólisis como la gluconeogénesis son procesos irreversibles en las células. En los animales ambas rutas tienen lugar mayoritariamente en el citosol, por lo que necesitan una regulación recíproca y coordinada. La regulación independiente de las dos rutas se consigue a través de controles ejercidos sobre los pasos enzimáticos específicos propios de cada una.

Empezaremos considerando las tres reacciones de rodeo de la gluconeogénesis.(Recuerde que el término "rodeo" ("bypass") hace referencia a los rodeos de las reacciones glucolíticas irreversibles.)

TABLA 14–2 Variaciones de energía libre de reacciones glucolíticas en los eritrocitos

Paso de la reacción glucolítica	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
① Glucosa + ATP ⟶ glucosa 6-fosfato + ADP	−16,7	−33,4
② Glucosa 6–fosfato ⇌ fructosa 6–fosfato	1,7	0 a 25
③ Fructosa 6-fosfato + ATP ⟶ fructosa 1,6-bisfosfato + ADP	−14,2	−22,2
④ Fructosa 1,6-bisfosfato ⇌ dihidroxiacetona fosfato + gliceraldehído 3-fosfato	23,8	−6 a 0
⑤ Dihidroxiacetona fosfato ⇌ gliceraldehído 3-fosfato	7,5	0 a 4
⑥ Gliceraldehído 3-fosfato + P_i + NAD^+ ⇌ 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H^+	6,3	−2 a 2
⑦ 1,3-Bisfosfoglicerato + ADP ⇌ 3-fosfoglicerato+ ATP	−18,8	0 a 2
⑧ 3-Fosfoglicerato ⇌ 2-fosfoglicerato	4,4	0 a 0,8
⑨ 2-Fosfoglicerato ⇌ fosfoenolpiruvato + H_2O	7,5	0 a 3,3
⑩ Fosfoenolpiruvato + ADP ⟶ piruvato + ATP	−31,4	−16,7

Nota: $\Delta G'^{\circ}$ es la variación de energía libre estándar tal como se define en el Capítulo 13 (p. 491-492). ΔG es la variación de energía libre calculada a partir de las concentraciones reales de los intermediarios glucolíticos, presentes en condiciones fisiológicas en los eritrocitos a pH 7. Las reacciones glucolíticas rodeadas en la gluconeogénesis se muestran en rojo. Las reacciones bioquímicas no están necesariamente ajustadas para H o carga (p. 501).



La conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato requiere dos reacciones exergónicas

La primera reacción de rodeo en la gluconeogénesis es la conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato (PEP). Esta reacción no puede tener lugar por simple inversión de la reacción de la piruvato quinasa (p. 538), que tiene una gran variación negativa de energía libre y que es, por tanto, irreversible en las condiciones existentes en las células intactas (Tabla 14–2, paso ⑩). En su lugar, la fosforilación del piruvato se consigue mediante una secuencia de reacciones de rodeo que, en los organismos eucariotas, requiere enzimas tanto del citosol como de la mitocondria. Tal como veremos, la ruta que se muestra en la Figura 14–16 y que se describe en detalle aquí es una de las dos rutas desde el piruvato al PEP; es la que predomina cuando el precursor de la gluconeogénesis es el piruvato o la alanina. Una segunda ruta, que se describe más adelante, es la que predomina cuando el precursor gluconeogénico es el lactato.

En primer lugar se transporta el piruvato desde el citosol a la mitocondria o se genera dentro de la mitocondria a partir de la alanina por transaminación en la que se transfiere el grupo α-amino de la alanina (que forma piruvato) a un α-cetoácido carboxílico (las reacciones de transaminación se discuten en detalle en el Capítulo 18). A continuación, la **piruvato carbo-**

FIGURA 14–16 Rutas opuestas de la glucólisis y de la gluconeogénesis en el hígado de rata. Las reacciones de la glucólisis se muestran en el lado izquierdo en rojo; la ruta opuesta de la gluconeogénesis se muestra a la derecha en azul. Los puntos principales de regulación de la gluconeogénesis que se muestran aquí se discuten posteriormente en este capítulo y con mayor detalle en el Capítulo 15. La Figura 14–19 muestra una ruta alternativa para el oxalacetato producido en la mitocondria.

xilasa, enzima mitocondrial que requiere el coenzima **biotina,** convierte el piruvato en oxalacetato **(Fig. 14–17)**:

$$\text{Piruvato} + HCO_3^- + \text{ATP} \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{ADP} + P_i \quad (14\text{–}4)$$

La reacción de carboxilación utiliza biotina como transportador de HCO_3^- activado tal como se muestra en la **Figura 14–18**; el mecanismo de reacción se muestra en la Figura 16–16. (Observe que el HCO_3^- se forma por ionización del ácido carbónico producido a partir de CO_2 y H_2O.) El HCO_3^- se fosforila por acción del ATP formando un anhídrido mixto (un carboxifosfato); a continuación la biotina desplaza el fosfato en la formación de la carboxibiotina.

La piruvato carboxilasa es el primer enzima regulador en la ruta de la gluconeogénesis que requiere acetil-CoA como efector positivo. (El acetil-CoA se produce mediante la oxidación de ácidos grasos (Capítulo 17) y su acumulación indica la disponibilidad de ácidos grasos como combustible.) Tal como veremos en el Capítulo 16 (véase la Fig. 16–15), la reacción de la piruvato carboxilasa puede reponer intermediarios de otra ruta metabólica central, el ciclo del ácido cítrico.

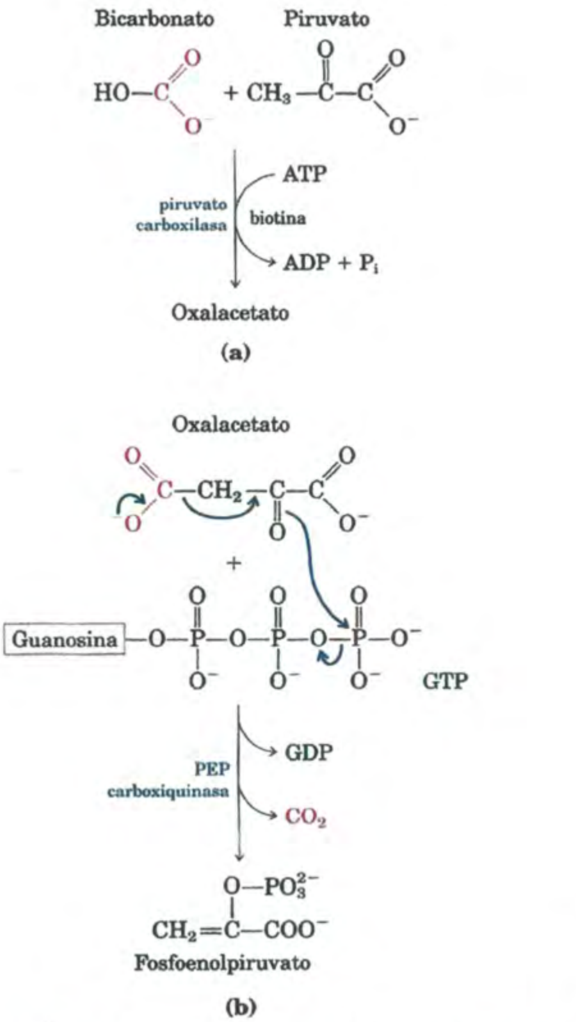


FIGURA 14–17 Síntesis de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato. **(a)** En la mitocondria, el piruvato se convierte en oxalacetato en una reacción catalizada por la piruvato carboxilasa que requiere biotina. **(b)** En el citosol, el oxalacetato se convierte en fosfoenolpiruvato por la PEP carboxiquinasa. El CO_2 incorporado en la reacción de la piruvato carboxilasa se pierde aquí en forma de CO_2. La descarboxilación conduce a un reordenamiento de electrones que facilita el ataque del oxígeno carbonílico del piruvato sobre el fosfato γ del GTP.

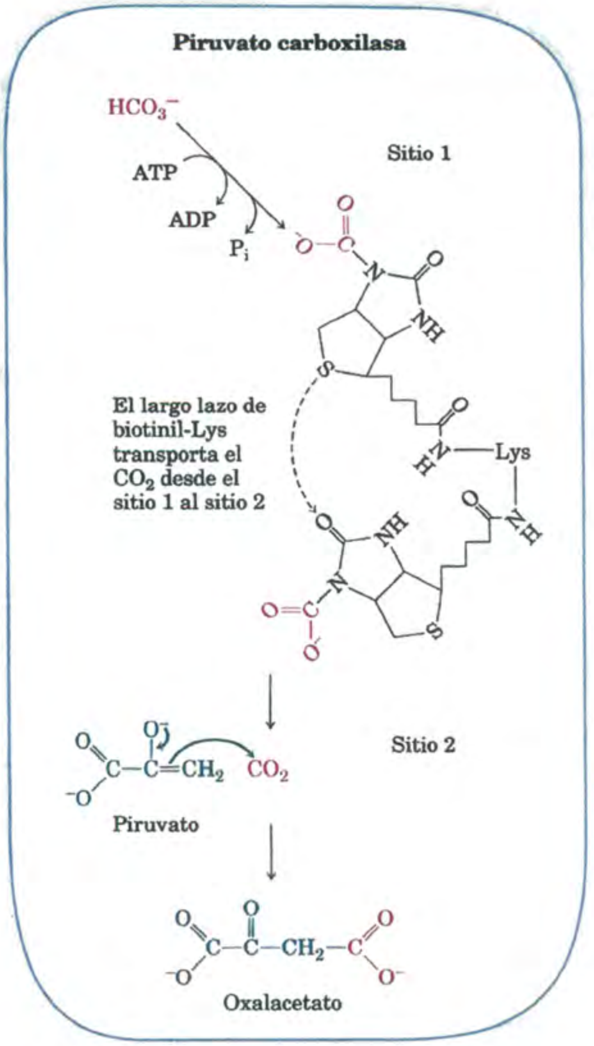


FIGURA 14–18 Papel de la biotina en la reacción de la piruvato carboxilasa. El cofactor biotina está unido de forma covalente al enzima a través de un enlace amida con el grupo ε-amino de un residuo Lys formando un biotinil-enzima. La reacción transcurre en dos fases que tienen lugar en dos sitios diferentes del enzima. En el sitio catalítico 1, el ión bicarbonato se convierte en CO_2 a expensas del ATP. A continuación el CO_2 reacciona con la biotina formando carboxibiotinil-enzima. El largo brazo formado por la biotina y la cadena lateral de la Lys a la que está unida transportan entonces el CO_2 del carboxibiotinil-enzima al sitio catalítico 2 en la superficie enzimática, en donde se libera el CO_2 que reacciona con el piruvato dando oxalacetato y regenerando el biotinil-enzima. El papel general de los brazos flexibles en el transporte de intermedios entre sitios activos del enzima se describe en la Figura 16–17, mientras que los detalles mecanísticos de la reacción de la piruvato carboxilasa se muestran en la Figura 16–16. Mecanismos similares se producen en otras reacciones de carboxilación dependientes de biotina tales como la catalizada por la propionil-CoA carboxilasa (véase la Fig. 17–11) y la acetil-CoA carboxilasa (véase la Fig. 21–1).

Debido a que la membrana mitocondrial no tiene transportador de oxalacetato, antes de ser exportado al citosol el oxalacetato formado a partir del piruvato debe ser reducido a malato mediante la **malato deshidrogenasa** mitocondrial a expensas de NADH:

$$\text{Oxalacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-malato} + \text{NAD}^+ \quad (14\text{–}5)$$

La variación de energía libre estándar de esta reacción es muy elevada, pero en condiciones fisiológicas (que incluyen una concentración muy baja de oxalacetato) $\Delta G \approx 0$, por lo que la reacción es muy fácilmente reversible. La malato deshidrogenasa mitocondrial funciona tanto en la gluconeogénesis como en el ciclo del ácido cítrico, aun cuando el flujo global de metabolitos en ambos procesos se da en direcciones opuestas.

El malato abandona la mitocondria vía un transportador específico de la membrana mitocondrial interna (véase la Fig. 19–30) y en el citosol el malato se reoxida a oxalacetato con producción de NADH citosólico:

$$\text{Malato} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (14\text{–}6)$$

El oxalacetato se convierte entonces en PEP por la **fosfoenolpiruvato carboxiquinasa** (Fig. 14–17). Esta reacción dependiente de Mg^{2+} requiere GTP como dador de fosfato:

$$\text{Oxalacetato} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{PEP} + CO_2 + \text{GDP} \quad (14\text{–}7)$$

La reacción es reversible en las condiciones intracelulares; la formación de un compuesto fosfato de alta energía (PEP) se compensa con la hidrólisis de otro (GTP).

La ecuación global para el conjunto de estas reacciones de rodeo, suma de las ecuaciones 14–4 a 14–7, es

$$\text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{GTP} + HCO_3^- \longrightarrow \text{PEP} + \text{ADP} + \text{GDP} + P_i + CO_2 \quad (14\text{–}8)$$
$$\Delta G'^\circ = 0{,}9 \text{ kJ/mol}$$

Para fosforilar una molécula de piruvato a PEP se han de gastar dos equivalentes fosfato de alta energía (uno del ATP y otro del GTP), cada uno de los cuales cede 50 kJ/mol en condiciones celulares.

Por el contrario, cuando el PEP se convierte en piruvato durante la glucólisis sólo se genera un ATP a partir del ADP. Aunque la variación de energía libre estándar ($\Delta G'^\circ$) de la reacción en dos fases desde el piruvato al PEP es de 0,9 kJ/mol, la variación de energía libre real (ΔG), calculada a partir de las concentraciones celulares de intermedios, es muy fuertemente negativa (–25 kJ/mol); ello es debido al rápido consumo del PEP en otras reacciones, de tal modo que su concentración permanece relativamente baja. De este modo la reacción es efectivamente irreversible en la célula.

Observe que el CO_2 incorporado al piruvato en la reacción de la piruvato carboxilasa es la misma molécula que se pierde en la reacción de la PEP carboxiquinasa (Fig. 14–17b). Esta secuencia de carboxilación-descarboxilación representa una forma de "activar" el piruvato, de modo que la descarboxilación del oxalacetato facilita la formación de PEP. En el Capítulo 21 veremos que se utiliza una etapa de carboxilación-descarboxilación similar para activar el acetil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21–1).

Existe una lógica en la ruta de estas reacciones a través de la mitocondria. La razón $[NADH]/[NAD^+]$ en el citosol es de aproximadamente 8×10^{-4}, alrededor de 10^5 veces menor que en la mitocondria. Debido a que el NADH citosólico se consume durante la gluconeogénesis (en la conversión de 1,3-bisfosfoglicerato en gliceraldehído 3-fosfato; Fig. 14–16), la biosíntesis de glucosa no puede tener lugar a menos que se suministre NADH. El transporte del malato desde la mitocondria hasta el citosol y su reconversión allí en oxalacetato tiene el efecto de transportar equivalentes de reducción en forma de NADH al citosol, en donde son escasos. Esta ruta desde el piruvato al PEP proporciona, por lo tanto, un equilibrio importante entre el NADH producido y el NADH consumido en el citosol durante la gluconeogénesis.

Cuando el lactato es el precursor gluconeogénico predomina un segundo rodeo del piruvato a PEP **(Fig. 14–19)**. Esta ruta utiliza el lactato producido por la glucólisis en los eritrocitos o el músculo anaeróbico, por ejemplo, siendo especialmente importante en los vertebrados de mayor tamaño después de un ejercicio vigoroso (Recuadro 14–2). La conversión del lactato en piruvato en el citosol de los hepatocitos produce NADH, por

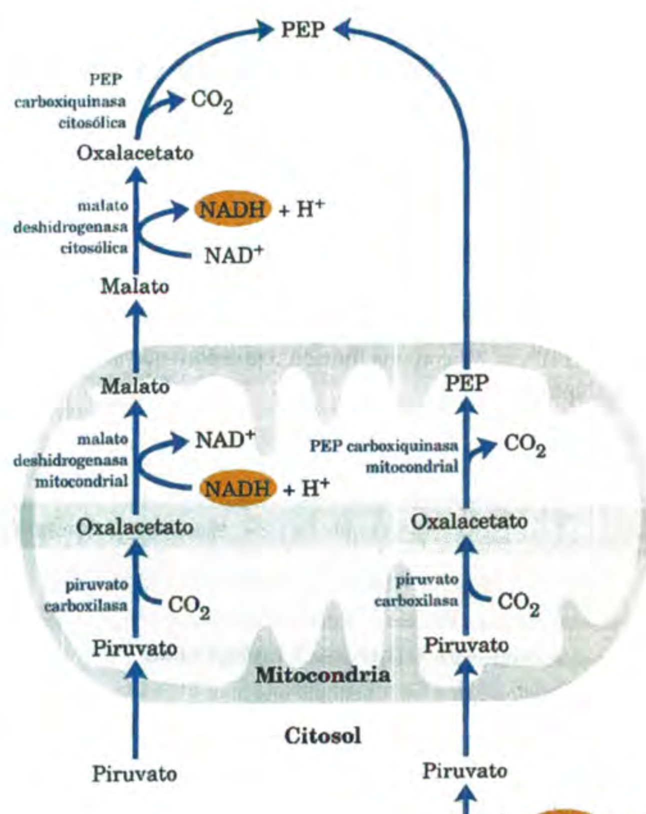


FIGURA 14–19 Rutas alternativas desde el piruvato al fosfoenolpiruvato. La importancia relativa de las dos rutas depende de la disponibilidad de lactato o piruvato y las necesidades citosólicas de NADH para la gluconeogénesis. La ruta de la derecha predomina cuando el lactato es el precursor, debido a que el NADH citosólico se genera en la reacción de la lactato deshidrogenasa y no se ha de transportar fuera de la mitocondria (véase texto).

lo que la exportación de equivalentes reductores (en forma de malato) desde la mitocondria ya no es necesaria. Una vez transportado el piruvato producido por la reacción de la lactato deshidrogenasa a la mitocondria, se convierte en oxalacetato por acción de la piruvato carboxilasa, tal como ya se ha descrito. No obstante, este oxalacetato se convierte directamente en PEP mediante un isozima mitocondrial de la PEP carboxiquinasa. A continuación se transporta el PEP fuera de la mitocondria para continuar en la ruta gluconeogénica. Los isozimas mitocondrial y citosólico de la PEP carboxiquinasa están codificados por genes en los cromosomas del núcleo diferentes, siendo otro ejemplo más de dos enzimas distintos que catalizan la misma reacción pero que tienen localizaciones celulares o papeles metabólicos diferentes (recuerde también los isozimas de la hexoquinasa).

La conversión de la fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato constituye el segundo rodeo

La segunda reacción glucolítica de las tres que no puede participar en la gluconeogénesis es la fosforilación de la fructosa 6-fosfato por parte de la PFK-1 (Tabla 14-2, Paso ③). Debido a que esta reacción es muy exergónica y, por este motivo, irreversible en las células intactas, la generación de la fructosa 6-fosfato a partir de la fructosa 1,6-bisfosfato (Fig. 14-16) está catalizada por un enzima diferente, la **fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1),** enzima dependiente de Mg^{2+}, que promueve la *hidrólisis* prácticamente irreversible del fosfato en C-1 (en este caso *no la* transferencia de grupo fosforilo al ADP):

$$\text{Fructosa 1,6-bisfosfato} + H_2O \longrightarrow \text{fructosa 6-fosfato} + P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -16{,}3 \text{ kJ/mol}$$

La FBPasa-1 se denomina así para distinguirla de otro enzima similar (FBPasa-2), con una función reguladora que se discute en el Capítulo 15.

La conversión de la glucosa 6-fosfato en glucosa constituye el tercer rodeo

El tercer rodeo es la reacción final de la gluconeogénesis, la desfosforilación de la glucosa 6-fosfato para dar glucosa (Fig. 14-16). La reacción inversa de la hexoquinasa (p. 532) requeriría la transferencia de un grupo fosforilo desde la glucosa 6-fosfato al ADP para dar ATP, lo que es una reacción energéticamente desfavorable (Tabla 14-2, paso ①). La reacción catalizada por la **glucosa 6-fosfatasa** no requiere la síntesis de ATP, sino que es una simple hidrólisis de un éster fosfato:

$$\text{Glucosa 6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{glucosa} + P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -13{,}8 \text{ kJ/mol}$$

Este enzima activado por Mg^{2+} se encuentra en la cara de la luz del retículo endoplasmático de los hepatocitos y de las células renales y epiteliales del intestino delgado (véase la Fig. 15-28), pero no en otros tejidos, que por tanto son incapaces de suministrar glucosa a la sangre. Si otros tejidos tuviesen glucosa 6-fosfatasa, la actividad del enzima hidrolizaría la glucosa 6-fosfato, que es necesaria en estos tejidos para la glucólisis. La glucosa producida por la gluconeogénesis en el hígado o en el riñón o bien la ingerida con la dieta se envía a estos otros tejidos, incluido el cerebro y el músculo, a través del torrente circulatorio.

La gluconeogénesis es energéticamente cara, pero es esencial

La suma de las reacciones biosintéticas que llevan del piruvato a la glucosa libre en la sangre (Tabla 14-3) es

$$2\ \text{Piruvato} + 4\text{ATP} + 2\text{GTP} + 2\text{NADH} + 2H^+ + 4H_2O \longrightarrow \text{glucosa} + 4\text{ADP} + 2\text{GDP} + 6P_i + 2\text{NAD}^+ \qquad (14\text{-}9)$$

Por cada molécula de glucosa formada a partir del piruvato, se requieren seis grupos fosfato de alta energía, cuatro del ATP y

TABLA 14-3 Reacciones secuenciales de la gluconeogénesis empezando a partir del piruvato

Reacción	
Piruvato + HCO_3^- + ATP ⟶ oxalacetato + ADP + P_i	×2
Oxalacetato + GTP ⇌ fosfoenolpiruvato + CO_2 + GDP	×2
Fosfoenolpiruvato + H_2O ⇌ 2-fosfoglicerato	×2
2-Fosfoglicerato ⇌ 3-fosfoglicerato	×2
3-Fosfoglicerato + ATP ⇌ 1,3-bisfosfoglicerato + ADP	×2
1,3-Bisfosfoglicerato + NADH + H^+ ⇌ gliceraldehído 3-fosfato + NAD^+ + P_i	×2
Gliceraldehído 3-fosfato ⇌ dihidroxiacetona fosfato	
Gliceraldehído 3-fosfato + dihidroxiacetona fosfato ⇌ fructosa 1,6-bisfosfato	
Fructosa 1,6-bisfosfato ⟶ fructosa 6-fosfato + P_i	
Fructosa 6-fosfato ⇌ glucosa 6-fosfato	
Glucosa 6-fosfato + H_2O ⟶ glucosa + P_i	
Suma: 2 Piruvato + 4ATP + 2GTP + 2NADH + $2H^+$ + $4H_2O$ ⟶ glucosa + 4ADP + 2GDP + $6P_i$ + $2NAD^+$	

Nota: Las reacciones de rodeo están en rojo; todas las demás reacciones son pasos reversibles de la glucólisis. Las cifras a la derecha indican que la reacción se ha de contar dos veces debido a que se requieren dos precursores de tres carbonos para producir una molécula de glucosa. Las reacciones requeridas para reemplazar el NADH citosólico consumido en la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (la conversión de lactato en piruvato en el citosol o el transporte de equivalentes de reducción desde la mitocondria al citosol en forma de malato) no se consideran en este resumen. Las ecuaciones bioquímicas no necesariamente están ajustadas para H y carga (p. 501).

dos del GTP. Además, se requieren dos moléculas de NADH para la reducción de dos moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato. La ecuación 14–9 no es, claramente, el inverso de la ecuación para la conversión de la glucosa en piruvato por la glucólisis, que sólo requiere dos moléculas de ATP:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i + \text{NAD}^+ \longrightarrow 2 \text{ piruvato} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$$

La síntesis de glucosa a partir del piruvato es un proceso relativamente costoso. Gran parte del alto costo de energía es necesario para asegurar que la gluconeogénesis sea irreversible. En las condiciones intracelulares, la variación global de energía libre de la glucólisis es de al menos –63 kJ/mol. En las mismas condiciones la ΔG global de la gluconeogénesis desde el piruvato es –16 kJ/mol. De este modo tanto la glucólisis como la gluconeogénesis son procesos esencialmente irreversibles en las células.

Los intermediarios del ciclo del ácido cítrico y muchos aminoácidos son glucogénicos

La ruta biosintética de la glucosa antes descrita permite la síntesis neta de glucosa no sólo desde el piruvato sino también de los intermediarios de cuatro, cinco y seis carbonos del ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16). Citrato, isocitrato, α-cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato y malato son todos ellos intermediarios del ciclo del ácido cítrico que se pueden oxidar dando oxalacetato (véase la Fig. 16–7). Algunos átomos de carbono, o todos, de la mayoría de aminoácidos procedentes de las proteínas se convierten en último término en piruvato o en intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Tales aminoácidos pueden, por tanto, experimentar una conversión neta en glucosa, por lo que se denominan aminoácidos **glucogénicos** (Tabla 14–4). La alanina y la glutamina, principales moléculas transportadoras de grupos amino desde los tejidos extrahepáticos al hígado (véase la Fig. 18–9), son aminoácidos glucogénicos muy importantes en los mamíferos. Después de eliminar sus grupos amino en las mitocondrias hepáticas, los esqueletos carbonados restantes (piruvato y α-cetoglutarato, respectivamente) se canalizan rápidamente hacia la gluconeogénesis.

TABLA 14–4 Aminoácidos glucogénicos agrupados según su sitio de entrada

Piruvato	**Succinil-CoA**
Alanina	Isoleucina*
Cisteína	Metionina
Glicina	Treonina
Serina	Valina
Treonina	**Fumarato**
Triptófano*	Fenilalanina*
α-Cetoglutarato	Tirosina*
Arginina	**Oxalacetato**
Glutamato	Asparagina
Glutamina	Aspartato
Histidina	
Prolina	

Nota: Todos estos aminoácidos son precursores de glucosa sanguínea o de glucógeno hepático debido a que se pueden convertir en piruvato o en intermediarios del ciclo del ácido cítrico. De los 20 aminoácidos comunes, sólo leucina y lisina son incapaces de proporcionar carbono para la síntesis neta de glucosa.

*Estos aminoácidos también son cetogénicos (véase la Fig. 18–21).

Los mamíferos no pueden convertir los ácidos grasos en glucosa

No hay conversión neta de los ácidos grasos en glucosa en los mamíferos. Tal como veremos en el Capítulo 17, el catabolismo de la mayoría de ácidos grasos sólo da acetil-CoA. Éste no puede ser utilizado como precursor de la glucosa por los mamíferos porque la reacción de la piruvato deshidrogenasa es irreversible y las células no tienen otra ruta para convertir el acetil-CoA en piruvato. Las plantas, levaduras y muchas bacterias tienen una ruta (el ciclo del glioxilato; véase la Fig. 16–20) para convertir el acetil-CoA en oxalacetato, por lo que estos organismos pueden utilizar ácidos grasos como material de partida para la gluconeogénesis. Esto es de importancia especial, por ejemplo, durante la germinación de las semillas; antes de que se desarrollen las hojas y la fotosíntesis pueda proporcionar energía y glúcidos, las semillas utilizan los aceites almacenados en las mismas para la producción de energía y la biosíntesis de las paredes celulares.

Aunque los mamíferos no pueden convertir los ácidos grasos en glúcidos, pueden utilizar la pequeña cantidad de glicerol producido en la degradación de las grasas (triacil*gliceroles*) para la gluconeogénesis. La fosforilación del glicerol por la glicerol quinasa, seguida de la oxidación del carbono central, da dihidroxiacetona fosfato, que es un intermediario de la gluconeogénesis en el hígado.

Tal como veremos en el Capítulo 21, el glicerol fosfato es un intermediario esencial en la síntesis de triacilglicerol en los adipocitos, si bien estas células carecen de glicerol quinasa y, por tanto, simplemente no pueden fosforilar el glicerol. En lugar de ello, los adipocitos llevan a cabo una versión truncada de la gluconeogénesis conocida como **gliceroneogénesis:** la conversión del piruvato en dihidroxiacetona fosfato a través de las primeras reacciones de la gluconeogénesis, seguida de la reducción de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol fosfato (véase la Fig. 21–21).

La gluconeogénesis y la glucólisis están reguladas de forma recíproca

Si se permitiese que la glucólisis (conversión de glucosa en piruvato) y la gluconeogénesis (conversión de piruvato en glucosa) tuvieran lugar simultáneamente a velocidad elevada, el resultado sería el consumo de ATP y la producción de calor. Por ejemplo, la PFK-1 y la FBPasa-1 catalizan reacciones opuestas:

$$\text{ATP} + \text{fructosa 6-fosfato} \xrightarrow{\text{PFK-1}} \text{ADP} + \text{fructosa 1,6-bisfosfato}$$

$$\text{Fructosa 1,6-bisfosfato} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{FBPasa-1}} \text{fructosa 6-fosfato} + \text{P}_i$$

La suma de estas dos reacciones es

$$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}_i + \text{calor}$$

Estas dos reacciones, y otras varias en las dos rutas, están reguladas alostéricamente y por modificación covalente (fosfo-

rilación). En el Capítulo 15 consideraremos los mecanismos de esta regulación de forma mucho más detallada. Por el momento, es suficiente decir que las rutas están reguladas de manera que cuando aumenta el flujo de glucosa a través de la glucólisis, el flujo de piruvato hacia glucosa disminuye, y viceversa.

RESUMEN 14.4 Gluconeogénesis

- La gluconeogénesis es un proceso ubicuo de múltiples pasos en el que la glucosa se produce a partir del lactato, piruvato u oxalacetato, o cualquier compuesto (incluidos los intermediarios del ciclo del ácido cítrico) que se pueden convertir en uno de estos intermediarios. Siete de los pasos de la gluconeogénesis están catalizados por los mismos enzimas utilizados en la glucólisis; son las denominadas reacciones reversibles.
- Los tres pasos irreversibles de la ruta glucolítica son rodeados mediante reacciones catalizadas por enzimas gluconeogénicos: (1) conversión del piruvato en PEP a través del oxalacetato, catalizada por la piruvato carboxilasa y la PEP carboxiquinasa; (2) desfosforilación de la fructosa 1,6-bisfosfato por parte de la FBPasa-1; y (3) desfosforilación de la glucosa 6-fosfato por parte de la glucosa 6-fosfatasa.
- La formación de una molécula de glucosa a partir del piruvato requiere 4 ATP, 2 GTP y 2 NADH; se trata de un proceso caro.
- En los mamíferos la gluconeogénesis en el hígado, en el riñón y en el intestino delgado proporciona glucosa para su uso por el cerebro, músculos y eritrocitos.
- La piruvato carboxilasa es estimulada por el acetil-CoA incrementando la velocidad de la gluconeogénesis cuando la célula ya tiene cantidades adecuadas de otros sustratos (ácidos grasos) para la producción de energía.
- Los animales no pueden convertir el acetil-CoA obtenido de la oxidación de ácidos grasos en glucosa; las plantas y los microorganismos, en cambio, sí pueden.
- La glucólisis y la gluconeogénesis están reguladas recíprocamente para impedir el funcionamiento despilfarrador de ambas rutas al mismo tiempo.

14.5 Ruta de las pentosas fosfato para la oxidación de la glucosa

En la mayoría de tejidos animales el destino catabólico principal de la glucosa 6-fosfato es la degradación glucolítica a piruvato. A su vez la mayor parte del piruvato se oxida vía ciclo del ácido cítrico lo que lleva en último término a la generación de ATP. La glucosa 6-fosfato tiene, sin embargo, otros destinos catabólicos que conducen a productos especializados necesarios para la célula. La oxidación de la glucosa 6-fosfato a pentosas fosfato por la **ruta de las pentosas fosfato** (también llamada **ruta del fosfogluconato,** o **ruta de las hexosas monofosfato; Fig. 14–20**) es un caso de especial importancia en algunos tejidos. En esta ruta oxidativa, el $NADP^+$ es el aceptor electrónico, dando NADPH. Las células en rápida división, tales como las de la médula ósea y la mucosa intestinal, así como las de los tumores, utilizan la pentosa ribosa 5-fosfato para producir RNA, DNA y coenzimas tales como ATP, NADH, $FADH_2$ y coenzima A.

En otros tejidos el producto esencial de la ruta de las pentosas fosfato no son las pentosas sino el dador electrónico NADPH necesario para la biosíntesis reductora o para contrarrestar los efectos perniciosos de los radicales oxigenados. Los tejidos que llevan a cabo activamente la síntesis de ácidos grasos (hígado, tejido adiposo, glándula mamaria lactante) o la síntesis de colesterol y hormonas esteroideas (hígado, glándulas adrenales, gónadas) requieren el NADPH proporcionado por esta ruta. Los eritrocitos y las células del cristalino y de la córnea están directamente expuestas al oxígeno y de este modo a los dañinos radicales libres generados por el oxígeno. Al mantener una atmósfera reductora (una razón NADPH a $NADP^+$ elevada y una razón de glutatión reducido a oxidado alta) pueden prevenir o corregir las lesiones oxidativas sobre proteínas, lípidos y otras moléculas sensibles. En los eritrocitos, el NADPH producido por la vía de las pentosas fosfato es tan importante en la prevención de las lesiones oxidativas que un defecto genético en la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, el primer enzima de la vía, puede tener consecuencias médicas graves (Recuadro 14–4). ■

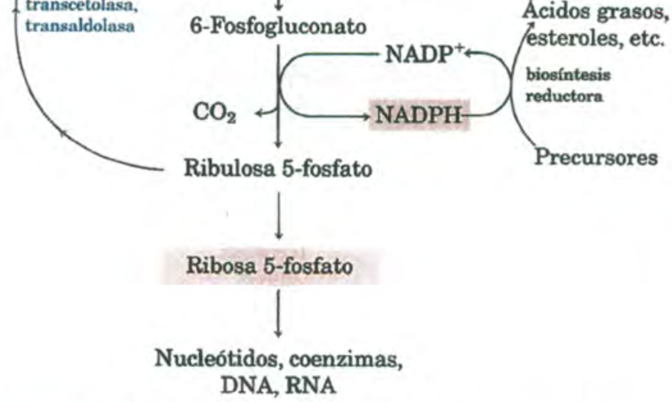


FIGURA 14–20 Esquema general de la ruta de las pentosas fosfato. El NADPH formado en la fase oxidativa es utilizado para reducir glutatión, GSSG (véase el Recuadro 14–4) y para sostener la biosíntesis reductora. El otro producto de la fase oxidativa es la ribosa 5-fosfato, que sirve como precursor de nucleótidos, coenzimas y ácidos nucleicos. En las células que no utilizan ribosa 5-fosfato para la biosíntesis, la fase no oxidativa recicla seis moléculas de la pentosa en cinco moléculas de la hexosa glucosa 6-fosfato, lo que permite la producción continua de NADPH y convierte la glucosa 6-fosfato en CO_2 (en seis ciclos).

RECUADRO 14–4 MEDICINA ¿Por qué Pitágoras no comía falafel? Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

Las habas, un ingrediente del falafel, han sido una fuente importante de alimentación en el Mediterráneo y en el Oriente Medio desde la antigüedad. El matemático y filósofo griego Pitágoras prohibió comer habas a sus seguidores quizás debido a que hacían que mucha gente sufriese la enfermedad llamada favismo, que podía ser fatal. En el favismo, los eritrocitos empiezan a lisarse al cabo de unas 24 a 48 horas de haber comido las habas, liberando hemoglobina en la sangre. Como resultado, se produce ictericia e incluso a veces fallo renal. Pueden observarse síntomas similares tras la ingestión del medicamento antimalárico primaquina o de sulfamidas o tras la exposición a ciertos herbicidas. Estos síntomas tienen una base genética: la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que afecta a unos 400 millones de personas en todo el mundo. La mayor parte de los individuos con déficit de G6PD son asintomáticos: sólo la combinación de la deficiencia de G6PD con ciertos factores medioambientales producen los síntomas clínicos.

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa cataliza el primer paso de la ruta de las pentosas fosfato (véase la Fig. 14–21), que produce NADPH. Este reductor, esencial para muchas rutas biosintéticas, protege también a las células de las lesiones oxidativas por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y por radicales libres superóxido, que son oxidantes muy reactivos generados como subproductos metabólicos y por la acción de fármacos tales como la primaquina y de productos naturales tales como la divicina (el ingrediente tóxico de las habas). Durante la destoxificación normal el H_2O_2 se convierte en H_2O gracias a la acción del glutatión reducido y de la glutatión peroxidasa. El glutatión oxidado se vuelve a convertir a la forma reducida por la acción de la glutatión reductasa y NADPH (Fig. 1). El H_2O_2 se puede transformar también en H_2O y O_2 por la acción de la catalasa, que también requiere NADPH. En los individuos deficientes de G6PD, la producción de NADPH está muy disminuida y, por tanto, la destoxificación del H_2O_2 está inhibida. El daño celular resultante consiste en la peroxidación de lípidos que conducen a la rotura de la membrana eritrocitaria y en la oxidación de proteínas y DNA.

La distribución geográfica de la deficiencia de G6PD es muy indicativa. En el África tropical, zonas de Oriente Medio y Sudeste asiático las frecuencias pueden llegar al 25%. Éstas son, al mismo tiempo, zonas donde la malaria tiene una gran prevalencia. Además de tales observaciones epidemiológicas, los estudios in vitro demuestran que el crecimiento de un parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*, está inhibido en los eritrocitos con déficit de G6PD. El parásito es muy sensible al daño oxidativo y muere con un nivel de estrés oxidativo que es tolerable para el huésped humano con déficit de G6PD. Debido a que la ventaja que proporciona esta resistencia a la malaria compensa la desventaja de una menor resistencia al daño oxidativo, la selección natural mantiene el genotipo G6PD-deficiente en las poblaciones humanas donde la malaria es frecuente. Sólo bajo un gran estrés oxidativo, provocado por drogas, herbicidas o divicina, la deficiencia en G6PD provoca graves problemas médicos.

Se cree que un medicamento contra la malaria tal como la primaquina actúa provocando estrés oxidativo al parásito. Resulta irónico que los fármacos contra la malaria puedan provocar una enfermedad utilizando el mismo mecanismo bioquímico que confiere resistencia a la malaria. La divicina también actúa como un fármaco antimalaria, por lo que la ingestión de habas puede proteger contra la misma. Por lo tanto, muchos discípulos de Pitágoras con actividad normal de la G6PD aumentaron de manera inconsciente el riesgo de contraer malaria ¡al no querer comer falafel!

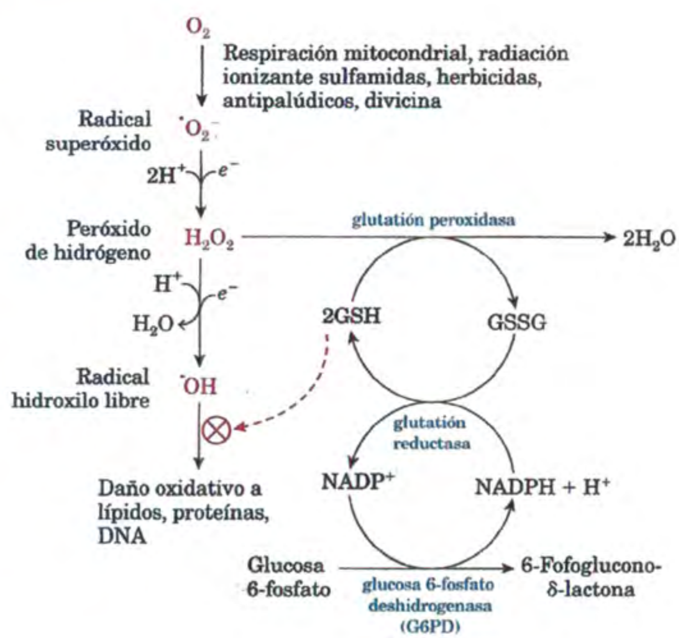


FIGURA 1 Papel del NADPH y del glutatión en la protección de las células frente a derivados de oxígeno altamente reactivos. El glutatión reducido (GSH) protege a las células destruyendo el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo libres. La regeneración del GSH a partir de su forma oxidada (GSSG) necesita NADPH producido por la reacción de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

La fase oxidativa produce pentosas fosfato y NADPH

La primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato **(Fig. 14–21)** es la oxidación de la glucosa 6-fosfato por la **glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)**, para formar 6-fosfoglucono-δ-lactona, un éster intramolecular. El $NADP^+$ es el aceptor electrónico y el equilibrio global está muy desplazado en la dirección de formación de NADPH. La lactona se hidroliza dando el ácido libre 6-fosfogluconato por una **lactonasa** específica y en el paso siguiente el 6-fosfogluconato se oxida y descarboxila por la **6-fosfogluconato deshidrogenasa,** for-

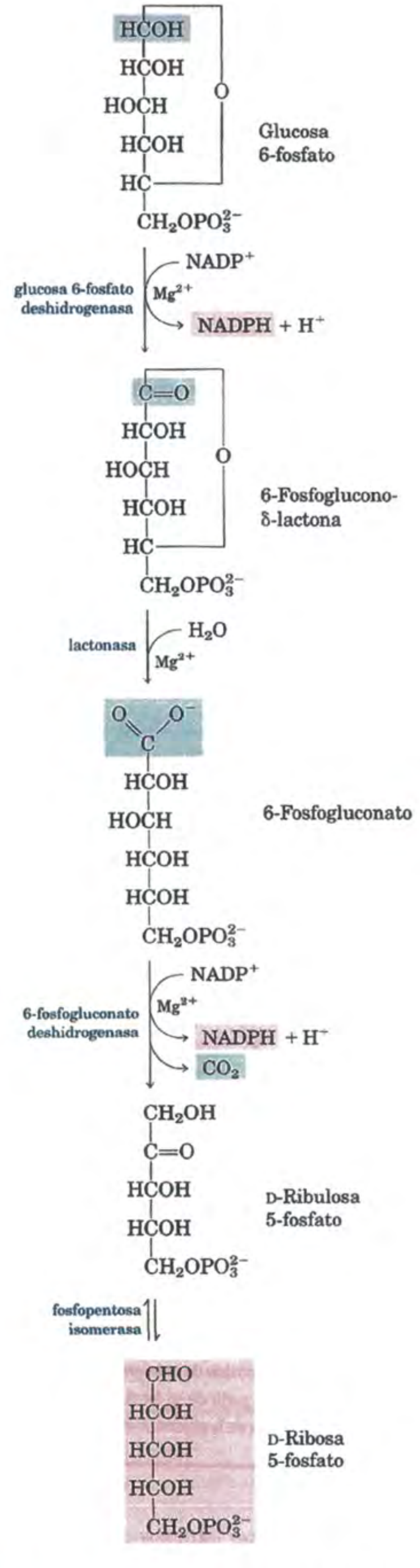


FIGURA 14–21 Reacciones oxidativas de la ruta de las pentosas fosfato. Los productos finales son la D-ribosa 5-fosfato, CO_2 y NADPH.

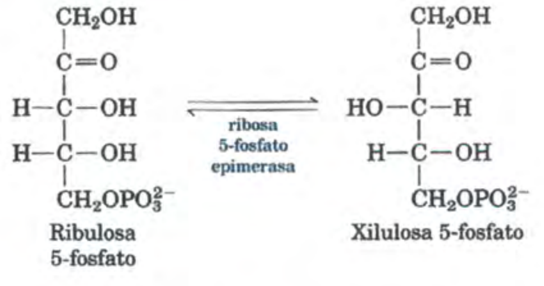
mando la cetopentosa ribulosa 5-fosfato; la reacción genera una segunda molécula de NADPH. (Esta ribulosa 5-fosfato es importante en la regulación de la glucólisis y de la gluconeogénesis, tal como veremos en el Capítulo 15.) La **fosfopentosa isomerasa** convierte la ribulosa 5-fosfato en su isómero aldosa ribosa 5-fosfato. En algunos tejidos la ruta de las pentosas fosfato acaba en este punto, siendo su ecuación global:

$$\text{Glucosa 6-fosfato} + 2\text{NADP}^+ + H_2O \longrightarrow \text{ribosa 5-fosfato} + CO_2 + 2\text{NADPH} + 2H^+$$

El resultado neto es la producción de NADPH, un reductor para las reacciones biosintéticas, y ribosa 5-fosfato, precursor de la síntesis de nucleótidos.

La fase no oxidativa recicla las pentosas fosfato a glucosa 6-fosfato

En los tejidos en los que se requiere principalmente NADPH, las pentosas fosfato producidas en la fase oxidativa de la ruta se reciclan a glucosa 6-fosfato. En esta fase no oxidativa la ribulosa 5-fosfato se epimeriza en primer lugar a xilulosa 5-fosfato:



A continuación, en una serie de reordenamientos de los esqueletos carbonados **(Fig. 14–22)**, seis azúcares fosfato de cinco carbonos se convierten en cinco azúcares fosfato de seis carbonos, completando el ciclo y permitiendo la oxidación continua de glucosa 6-fosfato con producción de NADPH. El reciclado continuo conduce en último término a la conversión de glucosa 6-fosfato en seis CO_2.

Dos enzimas únicos de la ruta de las pentosas fosfato actúan en estas interconversiones de azúcares: la transcetolasa y la transaldolasa.

La **transcetolasa** cataliza la transferencia de un fragmento de dos carbonos desde un dador cetosa a un aceptor aldosa **(Fig. 14–23a)**. En su primera aparición en la ruta de las pentosas fosfato, la transcetolasa transfiere C-1 y C-2 de la xilulosa 5-fosfato a la ribosa 5-fosfato, formando el producto de siete carbonos sedoheptulosa 7-fosfato (Fig. 14–23b). El fragmento de tres carbonos restante de la xilulosa es el gliceraldehído 3-fosfato.

En un paso posterior, la **transaldolasa** se encarga de catalizar una reacción similar a la reacción de la aldolasa en la glucólisis: se elimina un fragmento de tres carbonos de la sedoheptulosa 7-fosfato y se condensa con gliceraldehído 3-fosfato, formando fructosa 6-fosfato y la tetrosa eritrosa 4-fosfato **(Fig. 14–24)**. A continuación la transcetolasa vuelve a actuar, formando fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato a

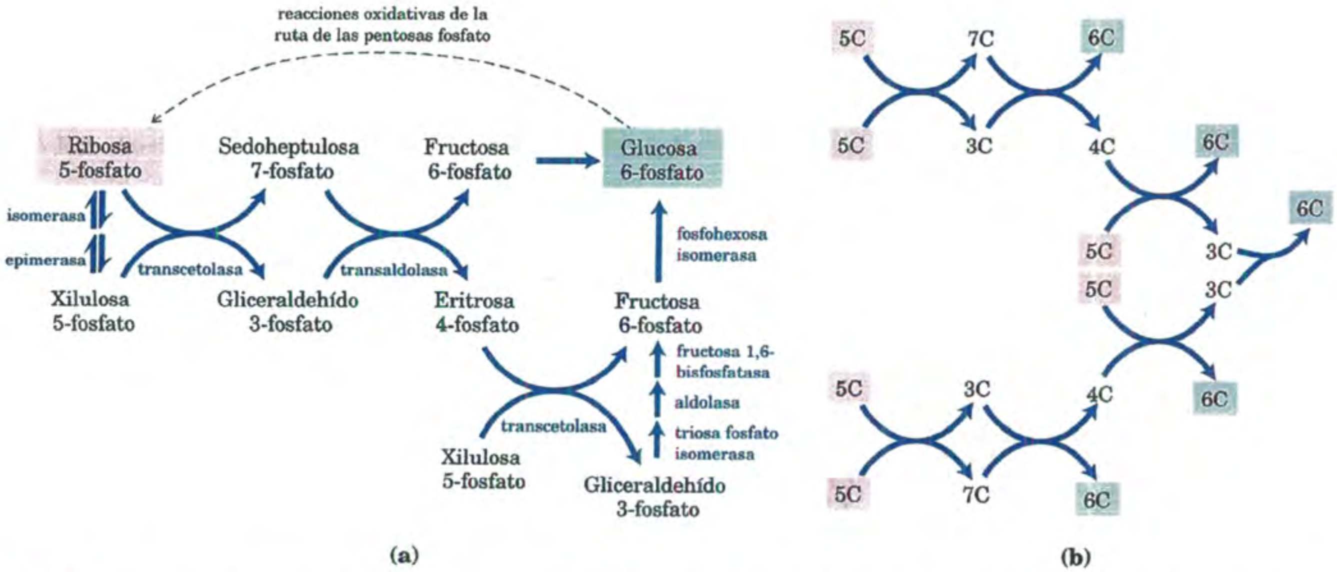


FIGURA 14–22 Reacciones no oxidativas de la ruta de las pentosas fosfato. **(a)** Estas reacciones convierten pentosas fosfato en hexosas fosfato, lo que permite que continúen las reacciones oxidativas (véase la Fig. 14–21). Los enzimas transcetolasa y transaldolasa son específicos de esta ruta; los otros enzimas también actúan en las rutas glucolítica o gluconeogénica. **(b)** Diagrama esquemático que muestra la ruta de seis pentosas (5C) a cinco hexosas (6C). Observe que intervienen dos juegos de las interconversiones mostradas en **(a)**. Cada reacción mostrada aquí es reversible; las flechas unidireccionales se utilizan sólo para clarificar la dirección de las reacciones durante la oxidación continua de la glucosa 6-fosfato. En las reacciones independientes de la luz en la fotosíntesis, la dirección de estas reacciones está invertida (véase la Fig. 20–10).

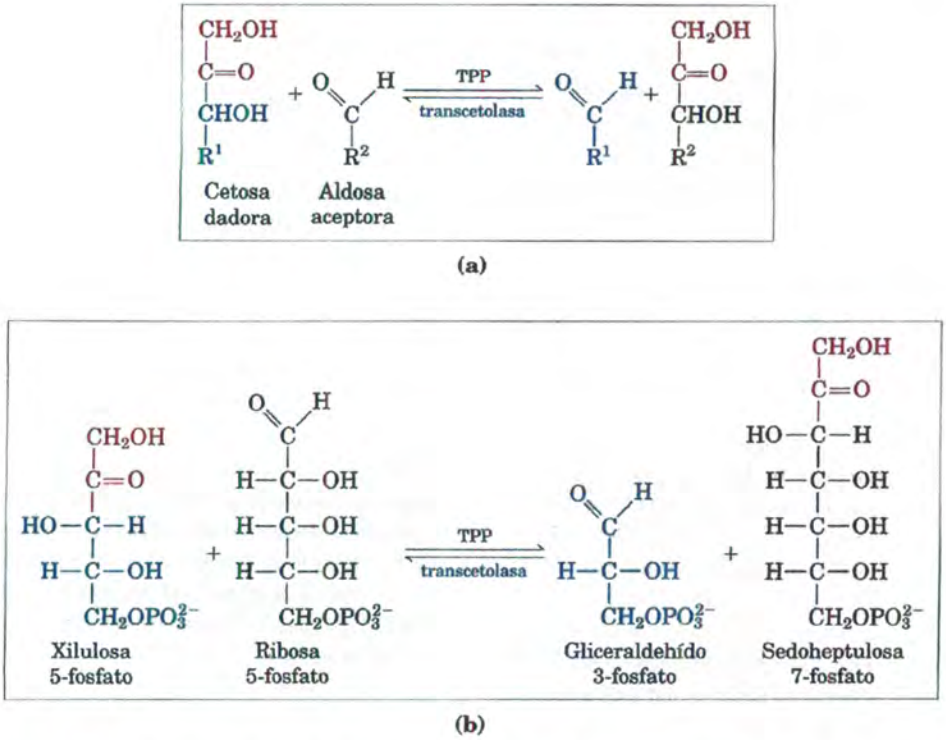


FIGURA 14–23 Primera reacción catalizada por la transcetolasa. **(a)** La reacción general catalizada por la transcetolasa es la transferencia de un grupo de dos carbonos, transportado de forma temporal sobre TPP ligado al enzima, desde un dador cetosa a un aceptor aldosa. **(b)** Conversión de dos pentosas fosfato en una triosa fosfato y un azúcar fosfato de siete carbonos, la sedoheptulosa 7-fosfato.

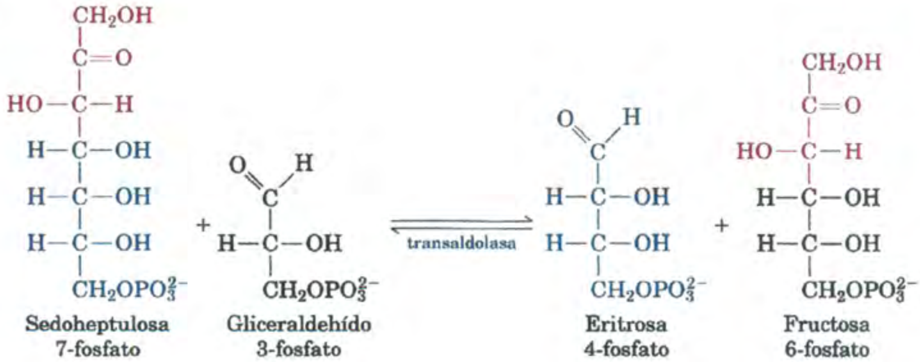


FIGURA 14–24 Reacción catalizada por la transaldolasa.

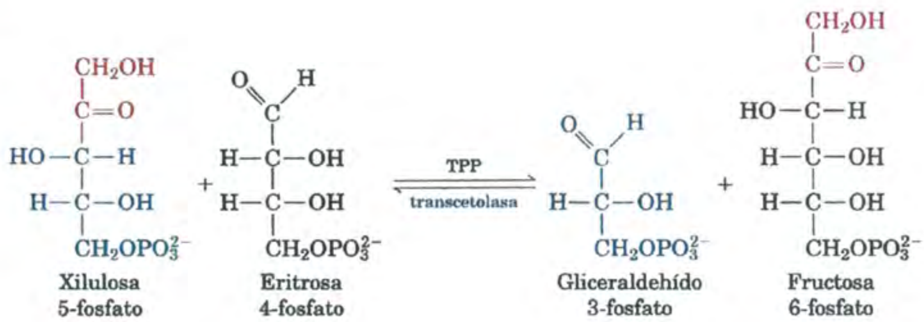


FIGURA 14–25 Segunda reacción catalizada por la transcetolasa.

partir de la eritrosa 4-fosfato y la xilulosa 5-fosfato **(Fig. 14–25)**. Dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato obtenido por dos repeticiones de estas reacciones pueden convertirse en una molécula de fructosa 1,6-bisfosfato sucede en la gluconeogénesis (Fig. 14–16); finalmente, la FBPasa-1 y la fosfohexosa isomerasa convierten la fructosa 1,6-bisfosfato en glucosa 6-fosfato. De esta forma, el ciclo queda completo: ¡en conjunto, seis pentosas fosfato se han convertido en cinco hexosas fosfato (Fig. 14–22b)!

La transcetolasa requiere el cofactor tiamina pirofosfato (TPP), que estabiliza un carbanión de dos carbonos en esta reacción **(Fig. 14–26a)** de la misma forma que lo hace en la reacción de la piruvato descarboxilasa (Fig. 14–14). La transaldolasa utiliza la cadena lateral de una Lys para formar una base de Schiff con el grupo carbonilo de su sustrato, una cetosa, estabilizando así un carbanión (Fig. 14–26b) crucial en el mecanismo de reacción.

El proceso descrito en la Figura 14–21 se conoce como **ruta oxidativa de las pentosas fosfato.** El primer y tercer pasos son oxidaciones con variaciones de energía libre estándar grandes y negativas, y son prácticamente irreversibles en la célula. Las reacciones de la parte no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (Fig. 14–22) son fácilmente reversibles, con lo que proporcionan de este modo un medio para convertir hexosas fosfato en pentosas fosfato. Tal como veremos en el Capítulo 20, un proceso que convierte hexosas fosfato en pentosas fosfato es esencial en la asimilación fotosintética del CO_2 por parte de las plantas. Esta ruta, la denominada **ruta reductora de las pentosas fosfato,** consiste básicamente en el inverso de las reacciones mostradas en la Figura 14–22 y emplea muchos de los mismos enzimas.

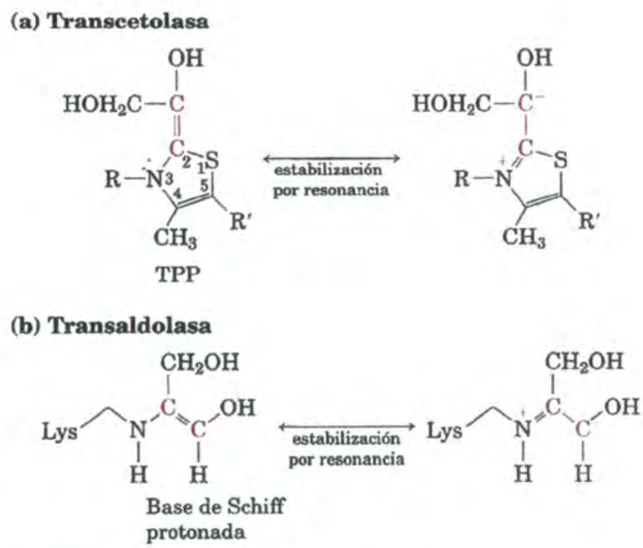


FIGURA 14–26 Intermedios carbanión estabilizados por interacciones covalentes con la transcetolasa y la transaldolasa. (a) El anillo del TPP estabiliza el carbanión en el grupo dihidroxietilo transportado por la transcetolasa; véase la Fig. 14–14 para la química de la acción del TPP. **(b)** En la reacción de la transaldolasa, la base de Schiff protonada formada entre el grupo ε-amino de la cadena lateral de una Lys y el sustrato estabiliza un carbanión C-3 formado después de la rotura aldólica.

Todos los enzimas de la ruta de las pentosas fosfato están localizados en el citosol, al igual que los de la glucólisis y la mayoría de los de la gluconeogénesis. De hecho, estas tres rutas

están conectadas a través de varios intermediarios y enzimas compartidos. El gliceraldehído 3-fosfato formado por la acción de la transcetolasa se convierte rápidamente en dihidroxiacetona fosfato por acción del enzima glucolítico triosa fosfato isomerasa, y estas dos triosas se pueden unir gracias a la intervención de la aldolasa que sucede en la gluconeogénesis, formando fructosa 1,6-bisfosfato. De modo alternativo, las triosas fosfato pueden oxidarse a piruvato mediante las reacciones glucolíticas. El destino de las triosas viene determinado por las necesidades relativas de la célula respecto a pentosas fosfato, NADPH y ATP.

El síndrome de Wernicke-Korsakoff está exacerbado por un defecto en la transcetolasa

El síndrome de Wernicke-Korsakoff es una enfermedad causada por una carencia grave de tiamina, un componente del TPP. El síndrome es más frecuente en los alcohólicos que en la población general; el consumo crónico del alcohol en grandes cantidades interfiere en la absorción intestinal de la tiamina.

El síndrome puede exacerbarse por una mutación en el gen de la transcetolasa que produce un enzima con una afinidad disminuida hacia su coenzima TPP, una afinidad que es una décima parte de la del enzima normal. Este defecto hace que los individuos sean mucho más sensibles a la carencia de tiamina: incluso una deficiencia moderada de la tiamina (tolerable en individuos con una transcetolasa sin mutar) puede disminuir el nivel de TPP por debajo del necesario para saturar el enzima. El resultado es una disminución de la velocidad de la ruta completa de las pentosas fosfato.

En las personas con el síndrome de Wernicke-Korsakoff esto produce un empeoramiento de los síntomas, que pueden incluir grave pérdida de memoria, confusión mental y parálisis parcial. ■

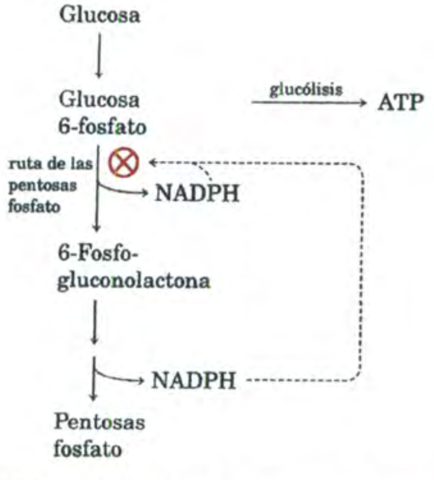


FIGURA 14–27 Papel del NADPH en la regulación del reparto de la glucosa 6-fosfato entre glucólisis y ruta de las pentosas fosfato. Cuando se forma NADPH más rápidamente de lo que se utiliza para la biosíntesis y reducción del glutatión (véase la Fig. 14–20), aumenta la [NADPH], con lo que inhibe el primer enzima de la ruta de las pentosas fosfato. El resultado es que hay más glucosa 6-fosfato disponible para la glucólisis.

La glucosa 6-fosfato se reparte entre la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato

El que la glucosa 6-fosfato entre en la glucólisis o en la ruta de las pentosas fosfato depende de las necesidades momentáneas de la célula y de la concentración de $NADP^+$ en el citosol. Sin este aceptor electrónico, no puede producirse la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato (catalizada por la G6PD). Cuando una célula está convirtiendo rápidamente NADPH en $NADP^+$ en reducciones biosintéticas, aumenta el nivel de $NADP^+$ lo que estimula alostéricamente la G6PD, incrementa de este modo el flujo de glucosa 6-fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato (**Fig. 14–27**). Cuando disminuye la demanda de NADPH, disminuye el nivel de $NADP^+$, la ruta de las pentosas fosfato se hace más lenta y, en su lugar, la glucosa 6-fosfato se utiliza como combustible para la glucólisis.

RESUMEN 14.5 Ruta de las pentosas fosfato para la oxidación de la glucosa

- La ruta *oxidativa* de las pentosas fosfato (ruta del fosfogluconato o ruta de la hexosa monofosfato) da lugar a la oxidación y la descarboxilación de la glucosa 6-fosfato en la posición C-1, reduciendo el $NADP^+$ a NADPH y formando pentosas fosfato.
- El NADPH proporciona poder reductor para las reacciones biosintéticas y la ribosa 5-fosfato es un precursor para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Los tejidos en rápido crecimiento y los tejidos con una biosíntesis activa de ácidos grasos, colesterol u hormonas esteroideas envían más glucosa 6-fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato que los tejidos con menos demanda de pentosas fosfato y de poder reductor.
- La primera fase de la ruta de las pentosas fosfato consiste en dos oxidaciones que convierten la glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato y reducen el $NADP^+$ a NADPH. La segunda fase comprende pasos no oxidativos que convierten pentosas fosfato en glucosa 6-fosfato, la cual empieza de nuevo el ciclo.
- En la segunda fase, la transcetolasa (con TPP como cofactor) y la transaldolasa catalizan la interconversión de azúcares de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos, con la conversión reversible de seis pentosas fosfato en cinco hexosas fosfato. En las reacciones asimiladoras de carbono de la fotosíntesis, los mismos enzimas catalizan el proceso inverso, denominado ruta *reductora* de las pentosas fosfato: la conversión de cinco hexosas fosfato en seis pentosas fosfato.
- Un defecto genético de la transcetolasa que disminuye su afinidad hacia el TPP agrava el síndrome de Wernicke-Korsakoff.
- La entrada de la glucosa 6-fosfato en la glucólisis o en la ruta de las pentosas fosfato está determinada mayoritariamente por las concentraciones relativas de $NADP^+$ y NADPH.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

glucólisis 528
fermentación 528
fermentación del ácido láctico 530
hipoxia 530
fermentación etanólica (alcohólica) 530
isozimas 532
acil fosfato 536
fosforilación a nivel de sustrato 537
fosforilación ligada a la respiración 537
fosfoenolpiruvato (PEP) 538
mutasas 544
isomerasas 544
intolerancia a la lactosa 545
galactosemia 545
tiamina pirofosfato (TPP) 549
gluconeogénesis 552
biotina 554
ruta de las pentosas fosfato 558
ruta del fosfogluconato 558
ruta de las hexosas monofosfato 558

Bibliografía

General

Fruton, J.S. (1999) *Proteins, Genes, and Enzymes: The Interplay of Chemistry and Biology*, Yale University Press, New Haven.
Este texto incluye una descripción histórica detallada de la investigación sobre la glucólisis.

Glucólisis

Boiteux, A. & Hess, B. (1981) Design of glycolysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **293**, 5–22.
Revisión a nivel intermedio de la ruta y la visión clásica sobre su control.

Dandekar, T., Schuster, S., Snel, B., Huynen, M., & Bork, P. (1999) Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* **343**, 115–124.
Revisión a nivel intermedio de la visión informática de la evolución de la glucólisis.

Dang, C.V. & Semenza, G.L. (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 68–72.
Breve revisión de la base molecular del incremento de la glucólisis en los tumores.

Erlandsen, H., Abola, E.E., & Stevens, R.C. (2000) Combining structural genomics and enzymology: completing the picture in metabolic pathways and enzyme active sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 719–730.
Revisión a nivel intermedio de las estructuras de los enzimas glucolíticos.

Gatenby, R.A. & Gillies, R.J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891–899.

Hardie, D.G. (2000) Metabolic control: a new solution to an old problem. *Curr. Biol.* **10**, R757–R759.

Harris, A.L. (2002) Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 38–47.

Heinrich, R., Melendez-Hevia, E., Montero, F., Nuno, J.C., Stephani, A., & Waddell, T.D. (1999) The structural design of glycolysis: an evolutionary approach. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 294–298.

Keith, B. & Simon, M.C. (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* **129**, 465–472.
Revisión a nivel intermedio.

Knowles, J. & Albery, W.J. (1977) Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triose phosphate isomerase. *Acc. Chem. Res.* **10**, 105–111.

Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L. (2005) Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 3.
Revisión breve de artículos clásicos, que también se pueden obtener on-line.

Kritikou, E. (2006) p53 turns on the energy switch. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 552–553.

Pelicano, H., Martin, D.S., Zu, R-H., & Huang, P. (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* **25**, 4633–4646.
Revisión a nivel intermedio.

Phillips, D., Blake, C.C.F., & Watson, H.C. (eds). (1981) The Enzymes of Glycolysis: Structure, Activity and Evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **293**, 1–214.
Colección de excelentes revisiones sobre los enzimas de la glucólisis, escrita a un nivel elevado pero comprensible para un estudiante de bioquímica.

Plaxton, W.C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 185–214.
Revisión muy útil sobre la localización subcelular de los enzimas glucolíticos y la regulación de la glucólisis en las plantas.

Rose, I. (1981) Chemistry of proton abstraction by glycolytic enzymes (aldolase, isomerases, and pyruvate kinase). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **293**, 131–144.
Revisión a nivel intermedio de los mecanismos de estos enzimas.

Shirmer, T. & Evans, P.R. (1990) Structural basis for the allosteric behavior of phosphofructokinase. *Nature* **343**, 140–145.

Smith, T.A. (2000) Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br. J. Biomed. Sci.* **57**, 170–178.
Revisión de los cuatro isozimas de la hexoquinasa en los mamíferos: sus propiedades y distribución en los tejidos y su expresión durante el desarrollo de tumores.

Rutas alimentadoras de la glucólisis

Elsas, L.J. & Lai, K. (1998) The molecular biology of galactosemia. *Genet. Med.* **1**, 40–48.

Novelli, G. & Reichardt, J.K. (2000) Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Mol. Genet. Metab.* **71**, 62–65.

Petry, K.G. & Reichardt, J.K. (1998) The fundamental importance of human galactose metabolism: lessons from genetics and biochemistry. *Trends Genet.* **14**, 98–102.

Van Beers, E.H., Buller, H.A., Grand, R.J., Einerhand, A.W.C., & Dekker, J. (1995) Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 197–262.

Fermentaciones

Demain, A.L., Davies, J.E., Atlas, R.M., Cohen, G., Hershberger, C.L., Hu, W.-S., Sherman, D.H., Willson, R.C., & Wu, J.H.D. (eds). (1999) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
Introducción clásica de todos los aspectos de las fermentaciones industriales.

Liese, A., Seelbach, K., & Wandrey, C. (eds). (2006) *Industrial Biotransformations*, John Wiley & Sons, New York.
Utilización de microorganismos en la industria para la síntesis de productos valiosos a partir de materiales de partida baratos.

Gluconeogénesis

Gerich, J.E., Meyer, C., Woerle, H.J., & Stumvoll, M. (2001) Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* **24**, 382–391.
Revisión de nivel intermedio de la contribución del tejido renal a la gluconeogénesis.

Gleeson, T. (1996) Post-exercise lactate metabolism: a comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 565–581.

Hers, H.G. & Hue, L. (1983) Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 617–653.

Matte, A., Tari, L.W., Goldie, H., & Delbaere, L.T.J. (1997) Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 8105–8108.

Ruta oxidativa de las pentosas fosfato

Chayen, J., Howat, D.W., & Bitensky, L. (1986) Cellular biochemistry of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities. *Cell Biochem. Funct.* **4**, 249–253.

Horecker, B.L. (1976) Unraveling the pentose phosphate pathway. En *Reflections on Biochemistry* (Kornberg, A., Cornudella, L., Horecker, B.L., & Oro, J., eds), pp. 65–72, Pergamon Press, Inc., Oxford.

Kletzien, R.F., Harris, P.K., & Foellmi, L.A. (1994) Glucose 6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue–specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.* **8**, 174–181.

Revisión de nivel intermedio.

Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L. (2005) Bernard L. Horecker's contributions to elucidating the pentose phosphate pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 26.

Breve revisión de artículos clásicos, también disponibles on-line.

Luzzato, L., Mehta, A., & Vulliamy, T. (2001) Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. En *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn (Scriver, C.R., Sly, W.S., Childs, B., Beaudet, A.L., Valle, D., Kinzler, K.W., & Vogelstein, B., eds), pp. 4517–4553, McGraw-Hill Inc., New York.

El tratado en cuatro volúmenes en el que aparece este artículo está lleno de información fascinante sobre las características clínicas y bioquímicas de centenares de enfermedades congénitas del metabolismo.

Martini, G. & Ursini, M.V. (1996) A new lease on life for an old enzyme. *BioEssays* **18**, 631–637.

Revisión de nivel intermedio de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, los efectos de las mutaciones de este enzima en el hombre y los efectos de las mutaciones supresoras en los ratones.

Notaro, R., Afolayan, A., & Luzzatto, L. (2000) Human mutations in glucose 6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history. *FASEB J.* **14**, 485–494.

Wood, T. (1985) *The Pentose Phosphate Pathway*, Academic Press, Inc., Orlando, FL.

Wood, T. (1986) Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochem. Funct.* **4**, 241–247.

Problemas

1. Ecuación de la fase preparatoria de la glucólisis Escriba ecuaciones bioquímicas igualadas de todas las reacciones del catabolismo de la glucosa a dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (fase preparatoria de la glucólisis), incluyendo la variación de energía libre estándar de cada ecuación. A continuación escriba la ecuación global o neta de la fase preparatoria de la glucólisis con la variación neta de energía libre estándar.

2. Fase de beneficios de la glucólisis en el músculo esquelético En el músculo esquelético activo en condiciones anaeróbicas, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en piruvato (fase de beneficios de la glucólisis) y el piruvato se reduce a lactato. Escriba ecuaciones bioquímicas igualadas de todas las reacciones de este proceso junto con la variación de energía libre estándar de cada una de ellas. A continuación escriba la ecuación global o neta de la fase de beneficios de la glucólisis (con el lactato como producto final) incluyendo la variación neta de energía libre estándar.

3. Transportadores GLUT Compare la localización de GLUT4 con la de GLUT2 y GLUT3 y explique por qué estas localizaciones son importantes en la respuesta del músculo, el tejido adiposo, el cerebro y el hígado a la insulina.

4. Producción de etanol en la levadura Cuando crece anaeróbicamente sobre glucosa, la levadura (*S. cerevisiae*) convierte el piruvato en acetaldehído y a continuación reduce el acetaldehído a etanol utilizando electrones del NADH. Escriba la ecuación de la segunda reacción y calcule su constante de equilibrio a 25 °C, dados los potenciales de reducción estándar de la Tabla 13–7.

5. Energética de la reacción de la aldolasa La aldolasa cataliza la reacción glucolítica

$$\text{Fructosa 1,6-bisfosfato} \longrightarrow \text{gliceraldehído 3-fosfato} + \text{dihidroxiacetona fosfato}$$

La variación de energía libre estándar de esta reacción en la dirección escrita es +23,8 kJ/mol. La concentración de los tres intermediarios en el hepatocito de un mamífero es: fructosa 1,6-bisfosfato, $1{,}4 \times 10^{-5}$ M; gliceraldehído 3-fosfato, 3×10^{-6} M y dihidroxiacetona fosfato, $1{,}6 \times 10^{-5}$ M. A temperatura corporal (37 °C), ¿cuál es la variación real de energía libre de la reacción?

6. Ruta de los átomos en la fermentación Se lleva a cabo un experimento de "pulso y persecución" en un extracto de levadura utilizando fuentes de carbono marcadas con ^{14}C en condiciones estrictamente anaeróbicas para producir etanol. El experimento consiste en incubar una pequeña cantidad de sustrato marcado con ^{14}C (el pulso) con el extracto de levadura sólo el tiempo justo para que cada intermediario de la ruta fermentativa quede marcado. Se "persigue" a continuación la marca a través de la ruta mediante la adición de un exceso de glucosa sin marcar. La persecución impide efectivamente la entrada de más glucosa marcada en la ruta.

(a) Si se utiliza [1-^{14}C]glucosa (glucosa marcada en el C-1 con ^{14}C) como sustrato, ¿cuál es la localización del ^{14}C en el producto etanol? Explíquelo.

(b) ¿En qué parte de la glucosa tendría que estar localizado el ^{14}C de la molécula inicial de glucosa para asegurar que toda la actividad ^{14}C se libera en forma de $^{14}CO_2$ durante la fermentación a etanol?. Explíquelo.

7. Calor a partir de las fermentaciones Los fermentadores industriales a gran escala requieren, generalmente, un enfriamiento vigoroso. ¿Por qué?

8. Fermentación para producir salsa de soja La salsa de soja se prepara fermentando una mezcla salada de semillas de soja y trigo junto con varios microorganismos, entre ellos la levadura, durante un período de 8 a 12 meses. La salsa resultante (después de eliminar los sólidos) es rica en lactato y etanol. ¿Cómo se forman estos dos productos?. Es necesario eliminar el oxígeno del tanque de fermentación para que la salsa de soja no tenga un fuerte sabor a vinagre (el vinagre es ácido acético diluido). ¿Por qué?

9. Equivalencia de las triosas fosfato A un extracto de levadura se añadió gliceraldehído 3-fosfato marcado con ^{14}C. Después de un corto período de tiempo, se aisló fructosa 1,6-bisfosfato marcada con ^{14}C en C-3 y C-4. ¿Dónde se localizaba el ^{14}C en el gliceraldheído 3–fosfato inicial? ¿De dónde procede el segundo ^{14}C que se encuentra en la fructosa 1,6-bisfosfato? Explíquelo.

10. Cortocircuito de la glucólisis Suponga que descubre una levadura mutante cuya ruta glucolítica es más corta debido a la presencia de un nuevo enzima que cataliza la reacción:

$$\text{Gliceraldehído 3-fosfato} + H_2O \xrightarrow{NAD^+ \quad NADH + H^+} \text{3-fosfoglicerato}$$

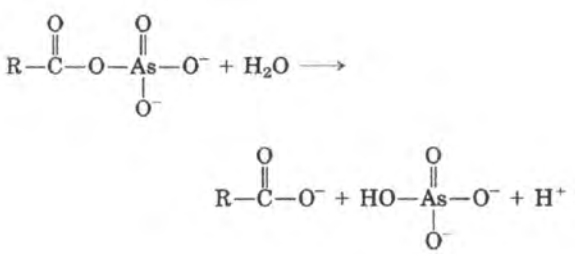
¿Sería un beneficio para la célula este acortamiento en la ruta glucolítica? Explíquelo.

11. Papel de la lactato deshidrogenasa Durante la actividad vigorosa la demanda de ATP en el tejido muscular aumenta muchísimo. En el músculo de la pata de conejo o en el del ala de pavo, el ATP se produce de manera casi exclusiva por fermentación láctica. El ATP se produce en la fase de beneficios de la glucólisis mediante dos reacciones, catalizadas por la fosfoglicerato quinasa y por la piruvato quinasa. Suponga que el músculo esquelético no tuviese lactato deshidrogenasa. ¿Podría llevar a cabo una actividad física intensa? O, lo que es lo mismo, ¿podría la glucólisis generar ATP a gran velocidad? Explíquelo.

12. Eficiencia de la producción de ATP en el músculo La transformación de glucosa en lactato en los miocitos sólo produce un 7% de la energía libre desprendida cuando la glucosa se oxida completamente a CO_2 y H_2O. ¿Significa esto que la glucólisis anaeróbica del músculo representa un despilfarro de glucosa? Explíquelo.

13. Variación de energía libre en la oxidación de las triosas fosfato La oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, transcurre con una constante de equilibrio desfavorable (K'_{eq} = 0,08; $\Delta G'^{\circ}$ = 6,3 kJ/mol) y, sin embargo, el flujo a través de este punto de la ruta glucolítica transcurre suavemente. ¿Cómo supera la célula este equilibrio desfavorable?

14. Envenenamiento por arseniato El arseniato es química y estructuralmente similar al fosfato inorgánico (P_i), y existen muchos enzimas que requieren fosfato y que también utilizan el arseniato. No obstante, los compuestos orgánicos de arseniato son menos estables que los compuestos análogos de fosfato. Por ejemplo, los acil *arseniatos* se descomponen rápidamente por hidrólisis:



Por otro lado, los acil *fosfatos,* tales como el 1,3-bisfosfoglicerato, son más estables y se transforman en las células por acción enzimática.

(a) Pronostique el efecto sobre la reacción neta catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa si se reemplazara el fosfato por arseniato.

(b) ¿Cuál sería la consecuencia para un organismo si se sustituyese el fosfato por arseniato? El arseniato es muy tóxico para la mayoría de organismos. Explíquelo.

15. Necesidad de fosfato en la fermentación alcohólica En 1906 Harden y Young realizaron una serie de estudios clásicos sobre la fermentación de la glucosa a etanol y CO_2 por extractos de levadura de cerveza e hicieron las siguientes observaciones. (1) El fosfato inorgánico era esencial para la fermentación; cuando se agotaba el suministro de fosfato cesaba la fermentación antes de que se utilizase toda la glucosa. (2) Durante la fermentación en estas condiciones, se acumulaban etanol, CO_2 y una hexosa bisfosfato. (3) Cuando se sustituía el fosfato por arseniato, no se acumulaba la hexosa bisfosfato pero transcurría la fermentación hasta que toda la glucosa se convertía en etanol y CO_2.

(a) ¿Por qué cesa la fermentación cuando se agota el suministro de fosfato?

(b) ¿Por qué se acumulan etanol y CO_2? ¿Es esencial la conversión del piruvato en etanol y CO_2? ¿Por qué? Identifique la hexosa bisfosfato que se acumula. ¿Por qué se acumula?

(c) ¿Por qué la sustitución del fosfato por arseniato impide la acumulación de la hexosa bisfosfato, permitiendo, no obstante, que la fermentación a etanol y CO_2 sea completa? (Véase el problema 14.)

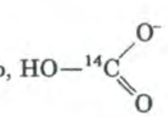
16. Papel de la vitamina niacina (nicotinamida) Un adulto durante una actividad física intensa necesita un aporte de unos 160 g de glúcidos diarios y de sólo unos 20 mg de niacina para una nutrición óptima. Conociendo el papel de la niacina en la glucólisis, ¿cómo se explicaría esta observación?

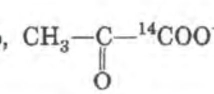
17. Síntesis del glicerol fosfato El glicerol 3-fosfato necesario para la síntesis de glicerofosfolípidos puede sintetizarse a partir de un intermediario glucolítico. Proponga una secuencia de reacciones para esta conversión.

18. Gravedad de los síntomas clínicos debidos a deficiencias enzimáticas Los síntomas clínicos de las dos formas de galactosemia (déficit de galactoquinasa o de UDP-glucosa:galactosa 1-fosfato uridililtransferasa) muestran una gravedad radicalmente diferente. Aunque ambas formas provocan molestias gástricas después de la ingestión de leche, la deficiencia de la transferasa también lleva a disfunción hepática, renal, del bazo y cerebral, y finalmente a la muerte. ¿Qué productos se acumulan en la sangre y tejidos en cada déficit enzimático? Calcule las toxicidades relativas de estos productos a partir de la información precedente.

19. Pérdida de masa muscular en la inanición Una consecuencia de la inanición es la reducción de la masa muscular. ¿Qué les sucede a las proteínas musculares?

20. Ruta de los átomos en la gluconeogénesis Un extracto hepático que puede llevar a cabo todas las reacciones metabólicas normales del hígado se incuba brevemente en experimentos separados con los siguientes precursores marcados con ^{14}C:

(a) [^{14}C]Bicarbonato, 

(b) [1-^{14}C]Piruvato, 

Trace la ruta de cada precursor a través de la gluconeogénesis. Indique la localización del ^{14}C en todos los intermediarios del proceso y en el producto glucosa.

21. Coste energético de un ciclo de glucólisis y gluconeogénesis ¿Cuál es el coste (en equivalentes de ATP) de transformar glucosa en piruvato a través de la glucólisis, y de nuevo piruvato en glucosa a través de la gluconeogénesis?

22. Relación entre gluconeogénesis y glucólisis ¿Por qué es importante que la gluconeogénesis no sea el inverso exacto de la glucólisis?

23. Energética de la reacción de la piruvato quinasa Explique en términos bioenergéticos de qué modo la conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato durante la gluconeogénesis supera la gran variación negativa de energía libre estándar de la reacción de la piruvato quinasa de la glucólisis.

24. Sustratos glucogénicos Un procedimiento común para determinar la efectividad de compuestos como precursores de glucosa en mamíferos es hacer ayunar al animal hasta que se han agotado los depósitos hepáticos de glucógeno y administrando seguidamente la sustancia en cuestión. Un sustrato que lleva a un incremento *neto* del glucógeno hepático se denomina glucogénico porque debe convertirse primeramente en glucosa 6-fosfato. Muestre mediante reacciones enzimáticas conocidas cuáles de las siguientes sustancias son glucogénicas:

(a) Succinato, $^{-}OOC-CH_2-CH_2-COO^{-}$

(b) Glicerol, $CH_2(OH)-CH(OH)-CH_2(OH)$

(c) Acetil-CoA, $CH_3-C(=O)-S\text{-}CoA$

(d) Piruvato, $CH_3-C(=O)-COO^{-}$

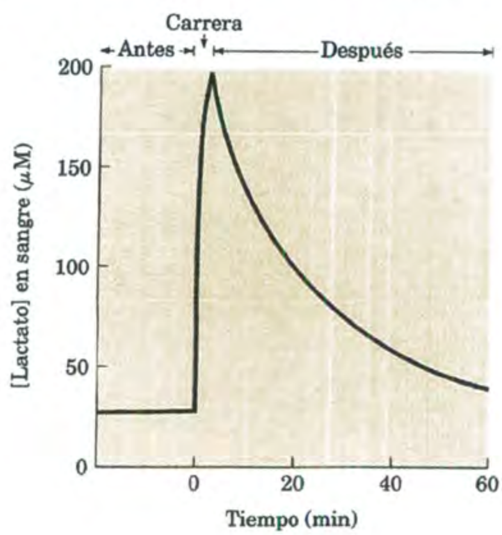
(e) Butirato, $CH_3-CH_2-CH_2-COO^{-}$

25. El etanol afecta los niveles de glucosa en sangre El consumo de alcohol (etanol), especialmente después de períodos de actividad vigorosa o después de no comer durante varias horas, produce una deficiencia de glucosa en sangre, lo que es conocido como hipoglucemia. El primer paso en el metabolismo del etanol en el hígado es la oxidación a acetaldehído, que está catalizada por la alcohol deshidrogenasa hepática:

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \longrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$$

Explica de qué modo esta reacción inhibe la transformación de lactato en piruvato. ¿Por qué esto produce hipoglucemia?

26. Niveles sanguíneos de lactato durante el ejercicio vigoroso El gráfico muestra la concentración de lactato en el plasma sanguíneo antes, durante y después de un sprint de 400 m.



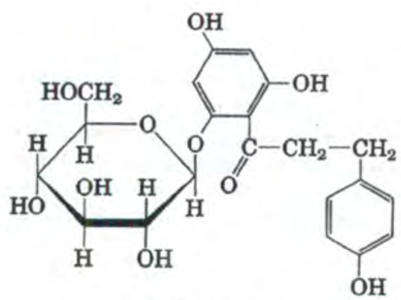
(a) ¿Cuál es la causa del rápido incremento en la concentración de lactato?

(b) ¿Cuál es la causa del descenso en la concentración de lactato después del sprint? ¿Por qué la disminución es más lenta que el aumento?

(c) ¿Por qué la concentración de lactato no es cero durante el estado de reposo?

27. Relación entre la fructosa 1,6-bisfosfatasa y los niveles de lactato en sangre Un defecto congénito en el enzima hepático fructosa 1,6-bisfosfatasa da lugar a unos niveles anormalmente elevados de lactato en el plasma sanguíneo. Explíquelo.

28. Efecto de la floridcina sobre el metabolismo de los glúcidos La floridcina, un glucósido tóxico de la corteza del peral, bloquea la reabsorción normal de la glucosa en el túbulo renal, provocando que prácticamente toda la glucosa de la sangre sea excretada en la orina. En un experimento, ratas alimentadas con floridcina y succinato sódico excretaron aproximadamente 0,5 moles de glucosa (producida en la gluconeogénesis) por cada mol de succinato sódico ingerido. ¿Cómo se transforma el succinato en glucosa? Explique la estequiometría.



Floridcina

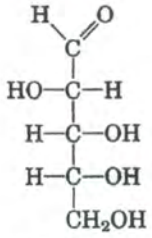
29. Exceso de captación de O_2 durante la gluconeogénesis El lactato absorbido por el hígado se convierte en glucosa. Este proceso requiere el aporte de 6 mol de ATP por cada mol de glucosa producido. La cuantía de este proceso puede medirse en cortes de hígado de rata mediante administración de [^{14}C]lactato y midiendo la cantidad de [^{14}C]glucosa producida. Debido a que se conoce la estequiometría del consumo de O_2 y producción de ATP (unos 5 ATP por O_2), podemos predecir el consumo extra de O_2 por encima de la tasa normal cuando se administra una cantidad dada de lactato. Sin embargo, cuando se mide la cantidad de O_2 extra utilizada en la síntesis de glucosa a partir del lactato, ésta es, de hecho, siempre más elevada que la pronosticada por las relaciones estequiométricas conocidas. Sugiera una posible explicación para esta observación.

30. Función de la ruta de las pentosas fosfato Si se utilizase la oxidación de la glucosa 6-fosfato por la ruta de las pentosas fosfato principalmente para generar NADPH para la biosíntesis, se acumularía el otro producto, ribosa 5-fosfato. ¿Qué problemas podría causar esta situación?

Problema de análisis de datos

31. Diseño de un sistema de fermentación La fermentación de materia vegetal para producir etanol y utilizarlo como combustible es un método potencial para reducir el uso de combustibles fósiles y así las emisiones de CO_2 que dan lugar al calentamiento global. Muchos microorganismos pueden degradar la celulosa y a continuación fermentar la glucosa a etanol.

No obstante, muchas fuentes potenciales de celulosa, incluidos residuos agrícolas, también contienen cantidades importantes de arabinosa que no fermenta fácilmente.



D-Arabinosa

Escherichia coli puede fermentar la arabinosa a etanol, pero no tolera normalmente niveles elevados de etanol, lo que limita su utilidad en la producción comercial de etanol. Otra bacteria, *Zymomonas mobilis*, tolera niveles elevados de etanol pero no fermenta la arabinosa. Deanda, Zhang, Eddy y Picataggio (1996) describieron sus esfuerzos para combinar las características más útiles de estos dos organismos introduciendo los genes de los enzimas del metabolismo de la arabinosa de *E. coli* en *Z. mobilis*.

(a) ¿Por qué es ésta una estrategia más sencilla que la inversa: modificar *E. coli* para que tolere mejor el etanol?

Deanda y colaboradores insertaron cinco genes de *E. coli* en el genoma de *Z. mobilis*: *araA*, que codifica la L-arabinosa isomerasa, que convierte L-arabinosa y L-ribulosa; *araB*, L-ribuloquinasa, que utiliza ATP para fosforilar L-ribulosa en C-5; *araD*, L-ribulosa 5-fosfato epimerasa, que interconvierte L-ribulosa 5-fosfato y L-xilulosa 5-fosfato; *talB*, transaldolasa y *tktA*, transcetolasa.

(b) Para cada uno de los tres enzimas *ara*, describa brevemente la transformación química que cataliza y, donde sea posible, nombre un enzima descrito en este capítulo que lleve a cabo una reacción análoga.

Los cinco genes de *E. coli* insertados en *Z. mobilis* permitieron la entrada de arabinosa en la fase no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (Fig. 14–22) en donde se convirtió en glucosa 6-fosfato y fermentó a etanol.

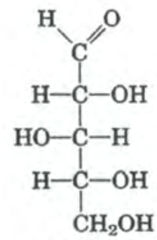
(c) ¿En qué azúcar convirtieron finalmente la arabinosa los tres enzimas *ara*?

(d) El producto de parte de (c) alimenta la ruta mostrada en la Figura 14–22. Combinando los cinco enzimas de *E. coli* señalados anteriormente con los enzimas de esta ruta, describa la ruta global para la fermentación de 6 moléculas de arabinosa a etanol.

(e) ¿Cuál es la estequiometría de la fermentación de 6 moléculas de arabinosa a etanol y CO_2? ¿Cuántas moléculas de ATP esperaría que generase esta reacción?

(f) *Z. mobilis* utiliza una ruta ligeramente diferente para la fermentación de etanol de la descrita en este capítulo. El resultado es que sólo se produce 1 ATP por molécula de arabinosa. Aunque ello es menos beneficioso para la bacteria, es mejor para la producción de etanol. ¿Por qué?

Otro azúcar que se encuentra frecuentemente en la materia vegetal es la xilosa.



D-Xilosa

(g) ¿Qué otros enzimas debería introducir en la cepa de *Z. mobilis* antes descrita para que pudiese utilizar tanto xilosa como arabinosa para producir etanol? No es necesario que nombre los enzimas (¡puede que incluso no existan en el mundo real!); dé solamente las reacciones que tendrían que catalizar.

Referencia

Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., & Picataggio, S. (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4465–4470.

Se ve así que la formación del glucógeno hepático a partir de ácido láctico establece una conexión importante entre el metabolismo del músculo y el del hígado. El glucógeno muscular es asequible en forma de azúcar sanguíneo a través de la intervención del hígado y, a su vez, el azúcar sanguíneo se convierte en glucógeno muscular. Hay, por tanto, un ciclo completo de la molécula de glucosa en el cuerpo... Se encontró que la adrenalina aceleraba este ciclo en la dirección de glucógeno muscular a glucógeno hepático... Se encontró que la insulina aceleraba el ciclo en la dirección de glucosa sanguínea a glucógeno muscular.

—*C. F. Cori y G. T. Cori, artículo en* Journal of Biological Chemistry, *1929*

15

Principios de regulación metabólica

La regulación metabólica, uno de los temas centrales de la bioquímica, es una de las características más notables de los organismos vivos. De los millares de reacciones catalizadas enzimáticamente que pueden tener lugar en la célula, es probable que no haya ninguna que se escape de una forma u otra de regulación. Esta necesidad de regular cada aspecto del metabolismo celular resulta claro cuando se examina la complejidad de las secuencias de reacciones metabólicas. Aunque es conveniente para el estudiante de bioquímica dividir los procesos metabólicos en "rutas" que desempeñan papeles concretos en la economía celular, tal separación no existe en la célula viva. Por el contrario, cada una de las rutas que se examinan en este libro está inextricablemente entrelazada con todas las demás rutas celulares en una red multidimensional de reacciones **(Fig. 15–1)**. Por ejemplo, en el Capítulo 14 describimos cuatro posibles destinos para la **glucosa 6-fosfato** en un hepatocito: degradación en la glucólisis para la producción de ATP, paso a la ruta de las pentosas fosfato para la producción de NADPH y pentosas fosfato, utilización en la síntesis de polisacáridos complejos de la matriz extracelular, o hidrólisis a glucosa y fosfato para reponer la glucosa sanguínea. De hecho, la glucosa 6-fosfato tiene también otros destinos posibles en el hepatocito; puede, por ejemplo, utilizarse para sintetizar otros azúcares, tales como glucosamina, galactosa, galactosamina, fucosa y ácido neuramínico, para utilizarse en la glucosilación de proteínas, o puede ser degradada parcialmente para proporcionar acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos y esteroles. La bacteria *Escherichia coli* puede utilizar la glucosa para producir el esqueleto carbonado de *cada una* de sus varios millares de moléculas dierentes. Cuando una célula utiliza la glucosa 6-fosfato para un fin determinado, tal "decisión" afecta a todas las demás vías en las que la glucosa 6-fosfato es un precursor o intermediario; cualquier cambio en la asignación de la glucosa 6-fosfato a una ruta afecta, directa o indirectamente, el flujo de metabolito a través de todas las demás.

Tales cambios en la asignación son comunes en la vida de una célula. Louis Pasteur fue el primero en describir el gran incremento, más de 10 veces, en el consumo de glucosa por un cultivo de levadura cuando pasaba de condiciones aeróbicas a anaeróbicas. Este "efecto Pasteur" se produce sin un cambio significativo de la concentración de ATP o de la mayoría de los centenares de intermediarios metabólicos y productos derivados de la glucosa. Un cambio similar tiene lugar en las células del músculo esquelético cuando un esprínter realiza la salida. La capacidad de una célula para llevar a cabo simultáneamente estos procesos metabólicos entrelazados (obteniendo cada producto en la cantidad necesaria en el momento adecuado, en presencia de perturbaciones importantes desde el exterior y sin generar productos de desecho) es un logro *asombroso*.

En este capítulo analizaremos el metabolismo de la glucosa con el fin de ilustrar algunos principios generales de la regulación metabólica. En primer lugar consideraremos los papeles generales de la regulación para alcanzar la homeostasis metabólica e introduciremos el análisis del control metabólico, un sistema para tratar de forma cuantitativa interacciones metabólicas complejas. A continuación describiremos las propiedades reguladoras específicas de los enzimas individuales que participan en el metabolismo de la glucosa; en el caso de la glucólisis y de la gluconeogénesis las actividades catalíticas de sus enzimas ya se describieron en el Capítulo 14. Aquí también discutiremos las propiedades catalíticas y reguladoras de los enzimas de la síntesis y degradación del glucógeno, un ejemplo muy bien estudiado de regulación metabólica. Al seleccionar el metabolismo glucídico para ilustrar los principios de la regulación metabólica, he-

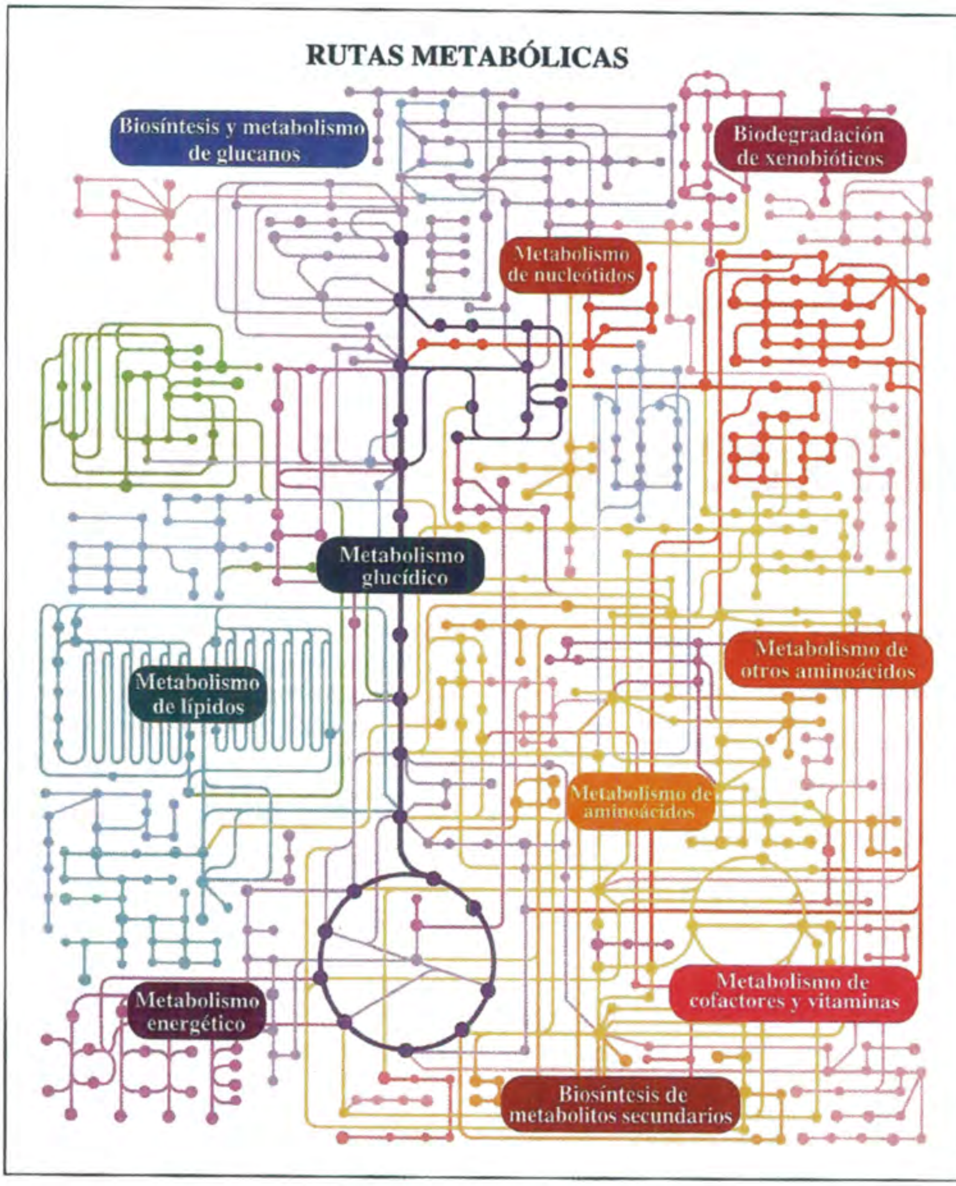


FIGURA 15–1 Metabolismo en forma de malla tridimensional. Una célula eucariótica típica tiene la capacidad de sintetizar unas 30.000 proteínas diferentes que catalizan miles de reacciones diferentes en las que intervienen muchos centenares de metabolitos, la mayoría compartidos por más de una "ruta". Esta visión general de las rutas metabólicas proviene de la base de datos online PATHWAY de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, que puede consultar online en www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/vaop01100.html). Se puede expandir más cada área para información más detallada a nivel de enzimas específicos e intermedios.

mos separado de forma artificial el metabolismo de las grasas y de los glúcidos. De hecho, estas dos actividades están estrechamente integradas tal como veremos en el Capítulo 23.

15.1 Regulación de las rutas metabólicas

Las rutas del metabolismo de la glucosa proporcionan, en la dirección catabólica, la energía esencial para oponerse a las fuerzas de la entropía y, en la dirección anabólica, precursores biosintéticos y una forma de almacenamiento de energía metabólica. Estas reacciones son tan importantes para la supervivencia que han aparecido mecanismos reguladores muy complejos para asegurar que los metabolitos transcurren a través de cada ruta en la dirección correcta y a la velocidad también correcta para satisfacer exactamente las circunstancias de cada momento de la célula o del organismo. Mediante diversos mecanismos que actúan a escalas de tiempo diferentes se producen los ajustes adecuados en la velocidad del flujo metabólico a través de toda la ruta cuando se producen cambios en las circunstancias exteriores.

A veces, las circunstancias cambian de manera espectacular. Por ejemplo, la demanda de producción de ATP en el músculo de un insecto volador puede aumentar en un factor de 100 en unos pocos segundos cuando el insecto se pone a volar. En los humanos, la disponibilidad de oxígeno puede disminuir debido a la hipoxia (disminución en el suministro de oxígeno a los tejidos) o en la isquemia (descenso en el flujo de sangre a los tejidos). Las proporciones relativas de glúcido, grasa y proteína

en la dieta varían de comida a comida y el suministro de combustibles obtenidos de la dieta es intermitente, lo que requiere ajustes metabólicos entre comidas y durante los períodos de inanición. La curación de heridas requiere grandes cantidades de energía y precursores biosintéticos.

Las células y organismos mantienen un estado estacionario dinámico

Combustibles tales como la glucosa entran en una célula y productos de desecho tales como el CO_2 salen de la misma, pero la masa y la composición aproximada de una célula, órgano o animal típicos no cambian de manera apreciable con el transcurso del tiempo; las células y los organismos existen en un estado estacionario dinámico. Para cada reacción metabólica en una ruta, el sustrato es proporcionado por la reacción precedente a la misma velocidad a la que se convierte en producto. Así, aunque la velocidad (v) del flujo metabólico, o **flujo,** a través de este paso de la ruta pueda ser alto y variable, la concentración del sustrato, S, permanece constante. Así para la reacción en dos pasos

$$A \xrightarrow{v_1} S \xrightarrow{v_2} P$$

cuando $v_1 = v_2$, [S] es constante. Por ejemplo, los cambios en v_1 para la entrada de glucosa de diversos orígenes en la sangre se equilibran mediante cambios en v_2 para la captación de glucosa de la sangre en los diversos tejidos, de modo que la concentración de glucosa sanguínea ([S]) se mantiene aproximadamente constane a 5 mM. Esto es la **homeostasis** a nivel molecular. El fallo en los mecanismos homeostáticos se encuentra a menudo en la raíz de las enfermedades humanas. En la diabetes mellitus, por ejemplo, la regulación de la concentración de glucosa sanguínea es defectuosa a consecuencia de la falta de insulina o de sensibilidad a la misma, lo que acarrea consecuencias médicas graves.

Cuando la perturbación externa no es meramente transitoria, o cuando una clase de célula se desarrolla dando otra, los ajustes en la composición y el metabolismo celulares pueden ser más grandes, pudiendo requerir cambios significativos y duraderos en la adjudicación de energía y precursores sintéticos para lograr un nuevo estado estacionario. Considere, por ejemplo, la diferenciación de las células madre de la médula ósea en eritrocitos. La célula precursora contiene un núcleo, mitocondrias y muy poca hemoglobina, si la hay, mientras que el eritrocito totalmente diferenciado contiene cantidades enormes de hemoglobina pero no tiene núcleo ni mitocondrias; la composición celular ha cambiado de manera permanente en respuesta a señales de desarrollo externas, con los cambios consiguientes en el metabolismo. Esta **diferenciación celular** requiere una regulación precisa de los niveles de proteínas celulares.

En el transcurso de la evolución, los organismos adquirieron una colección notable de mecanismos reguladores para mantener la homeostasis a los niveles molecular, celular y del organismo reflejada en la proporción relativa de genes que codifican la maquinaria reguladora. En los humanos unos 4.000 genes (~12% de todos los genes) codifican proteínas reguladoras, entre las que se encuentran una serie de receptores, reguladores de la expresión génica y ¡más de 500 proteína quinasas! En muchos casos, los mecanismos reguladores se solapan: un enzima está sujeto a regulación por varios mecanismos diferentes.

Se pueden regular tanto la cantidad como la actividad catalítica de un enzima

El flujo a través de una reacción catalizada por un enzima puede modularse mediante cambios en el *número* de moléculas de enzima o mediante cambios en la *actividad catalítica* de cada molécula enzimática ya presente. Tales cambios tienen lugar en escala de tiempo que van desde milisegundos a muchas horas, en respuesta a señales desde el interior o el exterior de la célula. Los cambios alostéricos, que son muy rápidos, se desencadenan generalmente de forma local mediante cambios en la concentración local de un molécula pequeña, un sustrato de la ruta en la que la reacción es un paso (glucosa en la glucólisis, por ejemplo), un producto de la ruta (ATP de la glucólisis) o un metabolito o cofactor clave (tal como el NADH) que indica el estado metabólico de la célula. Los segundos mensajeros (tales como AMP cíclico y Ca^{2+}) generados intracelularmente en respuesta a señales extracelulares (hormonas, citoquinas, etc.) también intervienen en la regulación alostérica, en una escala de tiempo ligeramente menor impuesta por la velocidad del mecanismo de transducción de señal (véase el Capítulo 12).

Las señales extracelulares (**Fig. 15–2**, ①) pueden ser hormonales (insulina o adrenalina, por ejemplo) o neuronales (acetilcolina), o pueden ser factores de crecimiento o citoquinas. El número de moléculas de un enzima dado en una célula es función de las velocidades relativas de síntesis y de degradación de dicho enzima. La velocidad de síntesis puede ajustarse por la activación (en respuesta a alguna señal exterior) de un factor de transcripción (Fig. 15–2, ②; descrita con más detalle en el Capítulo 28), Los **factores de transcripción** son proteínas nucleares que, al activarse, se unen a regiones específicas del DNA **(elementos de respuesta)** cerca del promotor de un gen (su punto de inicio de la transcripción) activando o reprimiendo la transcripción del gen, lo que lleva a un aumento o disminución de la síntesis e la proteína codificada. La activación de un factor de transcripción es, a veces, el resultado de su unión a un ligando específico y otras veces consecuencia de su fosforilación o desfosforilación. Cada gen está controlado por uno o más elementos de respuesta que son reconocidos por factores de transcripción específicos. Algunos genes tienen varios elementos de respuesta y son, por tanto, controlados por varios factores de transcripción, con lo que responden a varias señales. Grupos de genes que codifican proteínas que actúan conjuntamente, tales como los enzimas de la glucólisis o de la gluconeogénesis, a menudo comparten secuencias de elementos de respuesta comunes, de modo que una única señal, que actúa a través de un factor de respuesta determinado, aciva o inhibe todos estos genes conjuntamente. La regulación del metabolismo de los glúcidos por factores de transcripción específicos se examina en la Sección 15.3.

La estabilidad de los RNA mensajeros —su resistencia a la degradación por las ribonucleasas celulares (Fig. 15–2, ③)— varía de modo que la cantidad de un mRNA dado en la célula es una función de sus velocidades de síntesis y degradación (Capítulo 26). La velocidad a la que se traduce un mRNA a proteína en el ribosoma (Fig. 15–2, ④también está regulada y depende de varios factores descritos detalladamente en el Capítulo 27. Observe que un incremento de n veces en un mRNA no siempre significa un incremento de n veces de su producto proteico.

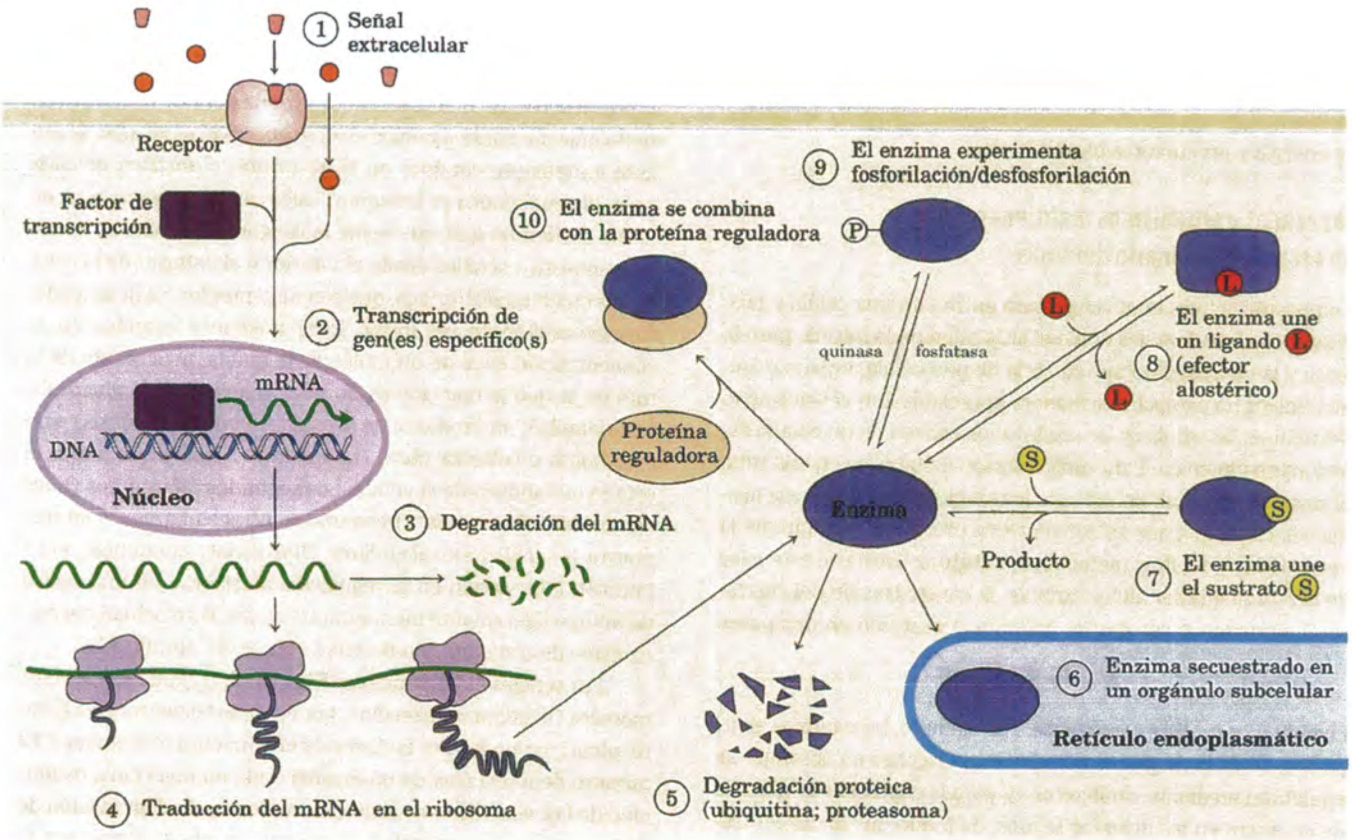


FIGURA 15–2 Factores que afectan la actividad de los enzimas. La actividad total de un enzima puede cambiarse mediante alteración del *número* de sus moléculas o su actividad *efectiva* en un compartimiento subcelular (① a ⑥), o modulando la *actividad* de las moléculas existentes (⑦ a ⑩), tal como se detalla en el texto. Un enzima puede ser influido por una combinación de tales factores.

Una vez sintetizadas, las moléculas de proteína tienen una vida finita, que puede ir de minutos a muchos días (Tabla 15–1). La velocidad de degradación proteica (Fig. 15–2, ⑤) difiere de un enzima a otro y depende de las condiciones celulares. Algunas proteínas son marcadas para su degradación mediante unión covalente de ubiquitina para su degradación en proteasomas, tal como se discute en el Capítulo 28 (véase, por ejemplo, el caso de la ciclina en la Fig. 12–46). El **recambio** rápido (síntesis seguida de degradación) es energéticamente caro, pero las proteínas con una vida corta pueden alcanzar nuevos niveles de estado estacionario mucho más rápidamente que las que tienen una vida larga; el beneficio de esta capacidad de respuesta rápida debe equilibrar o superar el coste para la célula.

TABLA 15–1 Vida media promedio de proteínas en tejidos de mamíferos

Tejido	Vida media (días)
Hígado	0,9
Riñón	1,7
Corazón	4,1
Cerebro	4,6
Músculo	10,7

Aún otra forma de alterar la actividad *efectiva* de un enzima es secuestrar el enzima y su sustrato en compartimientos diferentes (Fig. 15–2, ⑥). En el músculo, por ejemplo, la hexoquinasa no puede actuar sobre la glucosa hasta que el azúcar entra en el miocito procedente de la sangre al tiempo que la velocidad a la que entra depende de la actividad de transportadores de glucosa (véase la Tabla 11–3) de la membrana plasmática. En el interior de las células, compartimientos limitados por membranas segregan ciertos enzimas y sistemas enzimáticos y el transporte de sustratos a estos compartimientos puede constituir el factor limitante de la acción enzimática.

Como resultado de estos diversos mecanismos para regular la concentración de enzima, las células pueden cambiar de manera espectacular su dotación de enzimas en respuesta a variaciones en las circunstancias metabólicas. En los vertebrados, el hígado es el tejido más adaptable; por ejemplo, un cambio en la dieta, desde una elevada cantidad de glúcidos a alta cantidad de lípidos, afecta la transcripción de centenares de genes y, de ahí, la concentración de centenares de proteínas. Estos cambios globales en la expresión génica se pueden cuantificar mediante el uso de microchips de DNA (véase la Fig. 9–22) que ponen de manifiesto la dotación completa de los mRNA de un tipo celular o tejido (el **transcriptoma**) o mediante electroforesis bidimensional en gel (véase la Fig. 3–21) que pone de manifiesto la dotación proteica de un tipo celular u órgano (su **proteoma**). Ambas técnicas proporcionan muchos conocimientos sobre la regulación metabólica. El efecto de cambios en el proteoma es a

menudo un cambio en el conjunto total de metabolitos de baja masa molecular, el **metaboloma.**

Cuando los mecanismos reguladores que intervienen en la síntesis y degradación de proteínas han producido un cierto número de moléculas de cada enzima en una célula, la actividad de estos enzimas aún puede se regulada de otras maneras: por la concentración de sustrato, la presencia de efectores alostéricos, modificaciones covalentes o unión de proteínas reguladoras, todas las cuales pueden cambiar la actividad de una molécula individual de enzima (Fig. 15–2, ⑦ a ⑩).

Todos los enzimas son sensibles a la concentración de su sustrato(s) (Fig. 15–2, ⑦). Recuerde que en el caso más sencillo (un enzima que siga la cinética de Michaelis-Menten), la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la máxima cuando el sustrato está presente a una concentración igual a K_m (es decir, cuando el enzima está semisaturado con el sustrato). La actividad disminuye a [S] más bajas y cuando [S] << K_m la velocidad de la reacción depende de [S] de una manera lineal. Este hecho es importante porque las concentraciones intracelulares de sustrato son a menudo del mismo orden, o más bajas, que la K_m. La actividad de la hexoquinasa, por ejemplo, cambia con la [glucosa], y la [glucosa] intracelular varía con la concentración de glucosa de la sangre. Tal como veremos más adelante, las diferentes formas (isozimas) de la hexoquinasa tienen diferentes valores de K_m y quedan, por tanto, afectadas de manera diferente con los cambios de la [glucosa] intracelular, de maneras que tienen sentido fisiológico.

EJEMPLO PRÁCTICO 15–1 Actividad de un transportador de glucosa

Si K_t (el equivalente de K_m) para el transportador hepático de glucosa (GLUT2) es 40 mM, calcule el efecto sobre la velocidad de flujo de glucosa al interior de un hepatocito al incrementar la concentración de glucosa de 3 mM a 10 mM.

Solución: Utilizamos la Ecuación 11–1 (p. 393) para encontrar la velocidad inicial (flujo) de captación de glucosa

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]_{out}}{K_t + [S]_{out}}$$

A glucosa 3 mM

$$V_0 = V_{max}\,(3\text{ mM})/(40\text{ mM} + 3\text{ mM})$$
$$= V_{max}\,(3\text{ mM}/43\text{ mM}) = 0{,}07\ V_{max}$$

A glucosa 10 mM

$$V_0 = V_{max}\,(10\text{ mM})/(40\text{ mM} + 10\text{ mM})$$
$$= V_{max}\,(10\text{ mM}/50\text{ mM}) = 0{,}20\ V_{max}$$

Por tanto, un incremento de glucosa de 3 mM a 10 mM incrementa la velocidad de entrada de glucosa en el hepatocito en un factor 0,20/0,07 ≈ 3.

Se puede aumentar o disminuir la actividad enzimática mediante un efector alostérico (Fig. 15–2, ⑧; véase por ejemplo la Fig. 6–34). De forma típica los efectores alostéricos convierte la cinética hiperbólica en cinética sigmoidea, o viceversa (véase la Fig. 15–14b). En la parte con pendiente más pronunciada de la curva sigmoidea, un pequeño cambio en la concentración de sustrato, o de efector alostérico, puede tener un gran impacto en la velocidad de reacción. Recuerde del Capítulo 5 (p. 164) que la cooperatividad de un enzima alostérico se puede expresar con el coeficiente de Hill; cuanto más elevado el coeficiente mayor es la cooperatividad. Para un enzima alostérico con un coeficiente de Hill de 4, la actividad aumenta desde el 10% de V_{max} al 90% de V_{max} con sólo un incremento de 3 veces en [S], comparado con el incremento de 81 veces en [S] para un enzima sin efectos cooperativos (coeficiente de Hill de 1; Tabla 15–2).

TABLA 15–2 Relación entre el coeficiente de Hill y el efecto de las concentraciones de sustrato sobre la velocidad de reacción en los enzimas alostéricos

Coeficiente Hill (n_H)	Cambio en [S] requerido para aumentar V_0 desde 10% a 90% de V_{max}
0,5	×6.600
1,0	×81
2,0	×9
3,0	×4,3
4,0	×3

Las modificaciones covalentes de enzimas o de otras proteínas (Fig. 15–2; ⑨) tienen lugar en segundos o minutos después de recibir una señal reguladora, normalmente una señal extracelular. Con mucho las modificaciones más comunes son la fosforilación y desfosforilación **(Fig. 15–3)**; hasta la mitad de las proteínas de una célula eucariótica se fosforilan en algunas circunstancias. La fosforilación por una proteína quinasa específica puede alterar las características electrostáticas del sitio activo de un enzima, puede producir el movimiento de una región inhibidora de la proteína enzimática fuera del sitio activo, puede alterar la interacción del enzima con otras proteínas o puede forzar cambios de conformación que se traducen en cambios

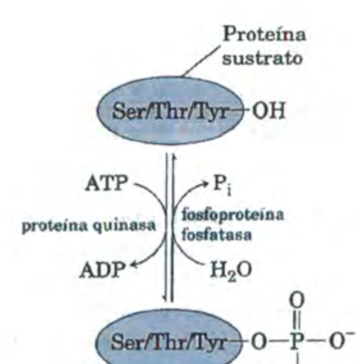


FIGURA 15–3 Fosforilación y desfosforilación de proteínas. Las proteína quinasas transfieren un grupo fosforilo desde el ATP a residuos Ser, Thr o Tyr en un enzima u otros sustratos proteicos. Las proteína fosfatasas eliminan el grupo fosforilo en forma de P_i.

de la V_{max} o de K_m. Para que la modificación covalente sea útil en la regulación, la célula debe ser capaz de volver el enzima alterado a su condición original. Una familia de fosfoproteína fosfatasas, algunas de las cuales como mínimo están también sujetas a regulación, se encargan de catalizar la desfosforilación de proteínas.

Finalmente, muchos enzimas están regulados por asociación y disociación de otra proteína reguladora (Fig. 15–2, ⑩). Por ejemplo, la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA; véase la Fig. 12–6) es inactiva hasta que cAMP separa las subunidades catalíticas de las reguladoras.

Los diversos mecanismos para alterar el flujo a través de un paso de una ruta metabólica no son mutuamente excluyentes. Es muy frecuente que un enzima sea regulado a nivel de la transcripción así como por mecanismos alostéricos y covalentes. La combinación proporciona un regulación rápida, suave y efectiva en respuesta a un gran número de perturbaciones y señales.

En la discusión que sigue, es útil pensar que los cambios en la actividad enzimática sirven para llevar a cabo dos papeles distintos aunque complementarios. Utilizamos el término **regulación metabólica** para referirnos a procesos que sirven para mantener la homeostasis a nivel molecular, para mantener algún parámetro celular (concentración de un metabolito por ejemplo) en un estado estacionario a lo largo del tiempo, aun cuando cambie el flujo de metabolitos a través de cambios en la ruta. El término **control metabólico** se refiere a un proceso que conduce a una variación en el rendimiento de una vía metabólica durante el tiempo en respuesta a alguna señal exterior o cambio en las circunstancias. La distinción, aunque útil, no es siempre fácil de reconocer.

En las células las reacciones lejos del equilibrio constituyen puntos comunes de regulación

En algunos pasos de una ruta metabólica, la reacción está próxima al equilibrio dentro de la célula en su estado estacionario dinámico **(Fig. 15–4)**. El flujo neto de metabolitos a través de estos pasos es la pequeña diferencia entre las velocidades de las reacciones directa e inversa, velocidades que son muy similares cuando la reacción está próxima al equilibrio. Pequeños cambios en la concentración de sustrato o de producto pueden dar lugar a grandes variaciones en la velocidad neta y pueden, incluso, cambiar la dirección del flujo neto. Podemos identificar estas reacciones próximas al equilibrio en un célula comparando su **cociente de acción de masas, *Q*,** con la constante de equilibrio de la reacción K'_{eq}. Recuerde que para la reacción $A + B \rightarrow C + D$, $Q = [C][D]/[A][B]$. Cuando Q y K'_{eq} se encuentran dentro de 1 o 2 órdenes de magnitud, la reacción está cerca del equilibrio. Éste es el caso en seis de las diez reacciones de la ruta glucolítica (Tabla 15–3).

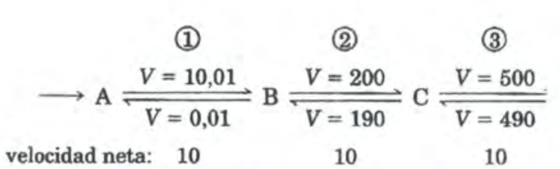


FIGURA 15–4 Etapas cerca del equilibrio y lejos del equilibrio en una ruta metabólica. Las etapas ② y ③ de esta ruta están cerca del equilibrio en la célula; en cada paso su velocidad (V) en el sentido directo es sólo ligeramente superior a la velocidad en el sentido inverso por lo que la velocidad directa neta (10) es relativamente baja y la variación de energía libre $\Delta G'$es próxima a cero. Un aumento en la [C] o [D] puede invertir la dirección de estos pasos. El paso ① se mantiene en la célula lejos del equilibrio; su velocidad en el sentido directo es mucho mayor que en el inverso. La velocidad neta del paso ① (10) es mucho mayor que la velocidad inversa (0,01) siendo idéntica a las velocidades netas de los pasos ② y ③ cuando la ruta está funcionando en estado estacionario. El paso ① tiene una $\Delta G'$ grande y negativa.

Otras reacciones están lejos del equilibrio en la célula. Por ejemplo, la K'_{eq} de la reacción de la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) es alrededor de 1.000, pero Q ([fructosa 1,6-bisfosfato][ADP]/[fructosa 6-fosfato][ATP] en un hepatocito en el estado estacionario es alrededor de 0,1 (Tabla 15–3). Es *debido a que* la reacción está tan lejos del equilibrio que el proceso es exergónico en condiciones celulares y tiende a ir en la dirección hacia adelante. La reacción se mantiene lejos del equilibrio porque, en las condiciones para el sustrato, producto y efector que prevalecen en la célula, la velocidad de conversión de la fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato está limitada por la actividad de la PFK-1, la cual, a su vez, está limitada por el número de moléculas de PFK-1 presentes y por las acciones de efectores alostéricos. Así, la velocidad hacia adelante neta de la reacción catalizada enzimáticamente es igual al flujo neto de intermediarios glucolíticos a través de otros pasos en la ruta mientras que el flujo inverso a través de la PFK-1 permanece próximo a cero.

La célula *no puede* permitir que las reacciones con constantes de equilibrio grandes alcancen el equilibrio. Si la [fructosa 6-fosfato], [ATP] y [ADP] en la célula se mantuviesen en sus valores normales (concentración milimolar baja) y se permitiese que la reacción de la PFK-1 alcanzase el equilibrio por un aumento en la [fructosa 1,6-bisfosfato], la concentración de fructosa 1,6-bisfosfato aumentaría al nivel molar, lo que causaría estragos osmóticos en la célula. Considérese otro caso: si se permitiese que la reacción $ATP \rightarrow ADP + P_i$ se acercase al equilibrio en la célula, la variación de energía libre real ($\Delta G'$) para esta reacción (ΔG_p; véase el Ejemplo Práctico 13–2, p. 503) se acercaría a cero, con lo que el ATP perdería el elevado potencial de transferencia del grupo fosforilo que lo hace valioso para la célula. Es, por tanto, esencial que los enzimas que catalizan la rotura del ATP y otras reacciones muy exergónicas en una célula sean sensibles a la regulación, de modo que cuando las circunstancias externas fuerzan cambios metabólicos se ajuste el flujo a través de estos enzimas para asegurar que la [ATP] permanece muy por encima de su nivel de equilibrio. Cuando se producen tales cambios metabólicos, se ajustan las actividades enzimáticas de todas las rutas interconectadas para mantener estos pasos críticos lejos del equilibrio. Así, no debe sorprender que muchos enzimas (tales como la de la PFK-1) que catalizan reacciones muy exergónicas estén sujetas a una serie de sutiles mecanismos de regulación. La multiplicidad de estos ajustes es tan grande que del examen de las propiedades de cualquier enzima de una ruta no podemos predecir si este enzima tiene una influencia fuerte sobre el flujo neto de la ruta completa. Se puede realizar una aproximación a este problema complejo mediante análisis del control metabólico, tal como se describe en la Sección 15.2.

TABLA 15–3 Constantes de equilibrio, cocientes de acción de masas y variaciones de energía libre de los enzimas del metabolismo glucídico

Enzima	K'_{eq}	Cociente de acción de masas, Q Hígado	Cociente de acción de masas, Q Corazón	¿Reacción cerca del equilibrio in vivo?*	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta G'$ (kJ/mol) en corazón
Hexoquinasa	1×10^3	2×10^{-2}	8×10^{-2}	No	−17	−27
PFK-1	$1{,}0 \times 10^3$	9×10^{-2}	3×10^{-2}	No	−14	−23
Aldolasa	$1{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}2 \times 10^{-6}$	9×10^{-6}	Sí	+24	−6,0
Triosa fosfato isomerasa	4×10^{-2}	—	$2{,}4 \times 10^{-1}$	Sí	+7,5	+3,8
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa + fosfoglicerato quinasa	2×10^3	6×10^2	9,0	Sí	−13	+3,5
Fosfoglicerato mutasa	1×10^{-1}	1×10^{-1}	$1{,}2 \times 10^{-1}$	Sí	+4,4	+0,6
Enolasa	3	2,9	1,4	Sí	−3,2	−0,5
Piruvato quinasa	2×10^4	7×10^{-1}	40	No	−31	−17
Fosfoglucosa isomerasa	4×10^{-1}	$3{,}1 \times 10^{-1}$	$2{,}4 \times 10^{-1}$	Sí	+2,2	−1,4
Piruvato carboxilasa + PEP carboxiquinasa	7	1×10^{-3}	—	No	−5,0	−23
Glucosa 6-fosfatasa	$8{,}5 \times 10^2$	$1{,}2 \times 10^2$	—	Sí	−17	−5,0

Fuente: K'_{eq} y Q se han tomado de Newsholme, E.A. y Start, C. (1973) *Regulation in Metabolism*, Wiley Press, New York, pp. 97, 263. $\Delta G'$ y $\Delta G'^{\circ}$ se calcularon a partir de estos datos.

*Con el fin de simplificar, cualquier reacción para la que el valor absoluto de la $\Delta G'$ calculada es inferior a 6 se considera próxima al equilibrio.

Los nucleótidos de adenina juegan un papel especial en la regulación metabólica

Después de la protección de su DNA contra las lesiones, quizá nada es más importante para una célula que mantener constante el suministro y concentración de ATP. Muchos enzimas que utilizan ATP tienen valores de K_m entre 0,1 y 1 mM, siendo la concentración de ATP en una célula típica alrededor de 5 mM. Si la [ATP] disminuyese significativamente, estos enzimas no estarían totalmente saturados por su sustrato (ATP) y disminuiría la velocidad de centenares de reacciones en las que interviene el ATP (**Fig. 15–5**); probablemente, la célula no sobreviviría a este efecto *cinético* sobre tantas reacciones.

Existe además un importante efecto *termodinámico*, a causa de la menor [ATP]. Debido a que el ATP se convierte en ADP o AMP, cuando se "gasta" para realizar trabajo celular, la razón [ATP]/[ADP] afecta profundamente todas las reacciones que emplean estos cofactores. (Lo mismo tambien es cierto para otros cofactores importantes, tales como $NADH/NAD^+$ y $NADPH/NADP^+$.) Por ejemplo, considere la reacción catalizada por la hexoquinasa:

$$\text{ATP + glucosa} \longrightarrow \text{ADP + glucosa 6-fosfato}$$

$$K'_{eq} = \frac{[\text{ADP}]_{eq}[\text{glucosa 6-fosfato}]_{eq}}{[\text{ATP}]_{eq}[\text{glucosa}]_{eq}} = 2 \times 10^3$$

Observe que esta expresión *sólo* es cierta cuando las concentraciones de reactivos y productos son las de *equilibrio* cuando $\Delta G' = 0$. A cualquier otro conjunto de concentraciones $\Delta G'$ no es cero. Recuerde (del Capítulo 13) que la razón de productos a sustratos (el cociente de acción de masas, Q) determina la magnitud y signo de $\Delta G'$ y, por tanto, la fuerza impusora, $\Delta G'$, de la reacción:

$$\Delta G' = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{ADP}][\text{glucosa 6-fosfato}]}{[\text{ATP}][\text{glucosa}]}$$

Dado que una alteración de esta fuerza impulsora influencia profundamente cada reacción en la que interviene el ATP, los organismos se han encontrado bajo una gran presión evolutiva para desarrollar mecanismos reguladores que respondan a la razón [ATP]/[ADP].

La concentración de AMP es aun un indicador mucho más sensible del estado energético de la célula que la [ATP]. Normal-

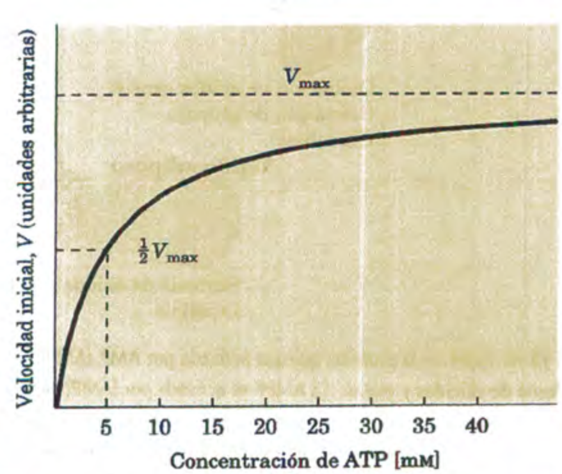


FIGURA 15–5 Efecto de la concentración de ATP sobre la velocidad inicial de un enzima dependiente de ATP típico. Estos datos experimentales dan una K_m para el ATP de 5 mM. La concentración de ATP en los tejidos animales es ~5 mM.

TABLA 15–4 Cambios relativos en la [ATP] y [AMP] cuando se consume

Nucleótido de adenina	Concentración antes de la desaparición del ATP (mM)	Concentración después de la desaparición del ATP (mM)	Cambio relativo
ATP	5,0	4,5	10%
ADP	1,0	1,0	0
AMP	0,1	0,6	600%

mente, las células tienen una concentración de ATP (5 a 10 mM) mucho mayor que la de AMP (<0,1 mM). Cuando algún proceso (por ejemplo la contracción muscular) consume ATP, el AMP se produce en dos pasos. Primero, la hidrólisis del ATP produce ADP; a continuación la reacción catalizada por la **adenilato quinasa** produce AMP:

$$2\text{ADP} \longrightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$$

Si la [ATP] disminuye en un 10%, el aumento *relativo* en la [AMP] es mucho mayor que el de la [ADP] (Tabla 15–4). No es sorprendente, por tanto, que muchos procesos reguladores dependan de cambios en la [AMP]. El mediador probablemente más importante de la regulación por AMP es la **proteína quinasa activada por AMP (AMPK),** que responde a un incremento en la [AMP] fosforilando proteínas clave y regulando, de este modo, sus actividades. El aumento en la [AMP] puede ser debida a una reducción en el suministro de nutriente o a un mayor ejercicio. La acción de la AMPK (que no debe ser confundida con la proteína quinasa dependiente de AMP *cíclico*; véase la Sección 15.5) aumenta el transporte de glucosa y activa la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos al tiempo que suprime los procesos que requieren energía tales como la síntesis de ácidos grasos, colesterol y proteínas **(Fig. 15–6)**. En el Capítulo 23 se describe con mayor detalle la AMPK, así como los mecanismos detallados mediante los que efectúa estos cambios.

Además del ATP, también han de estar presentes en la célula en concentraciones adecuadas cientos de intermediarios metabólicos. Por ejemplo, los intermediarios glucolíticos dihidroxiacetona fosfato y 3-fosfoglicerato son precursores de triacilgliceroles y serina, respectivamente. Cuando se necesitan estos productos, la velocidad de la glucólisis ha de ajustarse para proporcionarlos sin que se reduzca la producción glucolítica

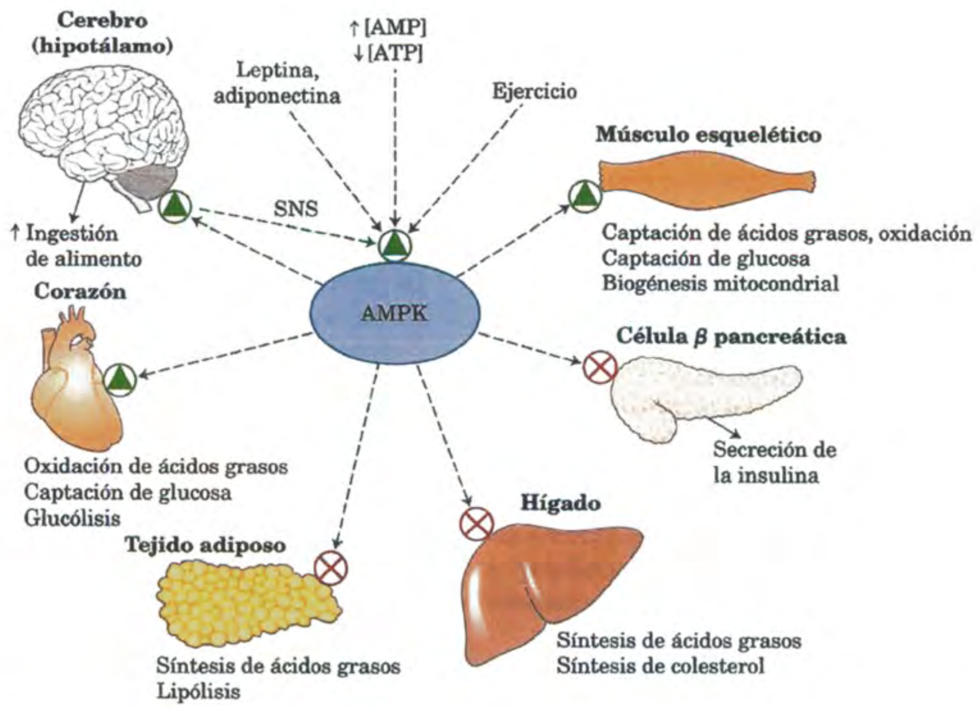


FIGURA 15–6 Papel de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el metabolismo de glúcidos y grasas. La AMPK es activada por [AMP] elevada o por [ATP] disminuida, por el ejercicio, por el sistema nervioso simpático (SNS) o por hormonas peptídicas producidas en el tejido adiposo (leptina y adiponectina, descritas con más detalle en el Capítulo 23). Cuando está activada, la AMPK fosforila proteínas diana y desplaza el metabolismo en diversos tejidos lejos de los procesos que consumen energía tales como la síntesis de glucógeno, ácidos grasos y colesterol; desplaza el metabolismo en los tejidos extrahepáticos hacia el uso de ácidos grasos como combustible, y desencadena la gluconeogénesis en el hígado para proporcionar glucosa al cerebro. En el hipotálamo, la AMPK estimula el comportamiento nutritivo para proporcionar más combustible con la dieta.

de ATP. Lo mismo es cierto para el mantenimiento de los niveles de otros cofactores importantes, tales como NADH y NADPH: las variaciones en sus cocientes de acción de masas (es decir, la razón de cofactor reducido a oxidado) tienen efectos globales sobre el metabolismo.

Por supuesto, las prioridades a nivel de *organismo* también han impulsado la evolución de los mecanismos reguladores. En los mamíferos, el cerebro no tiene prácticamente ninguna fuente de energía almacenada, por lo que depende de un aporte constante de glucosa desde la sangre. Si la glucosa sanguínea cae desde su concentración normal de 4 a 5 mM a la mitad de este nivel se produce confusión mental, y una reducción de cinco veces en la glucosa sanguínea puede conducir a coma y muerte. Para tamponar estos cambios en la concentración de glucosa sanguínea, la liberación de las hormonas insulina y glucagón, promovida por valores de glucosa sanguínea altos o bajos, respectivamente, pone en marcha cambios metabólicos que tienden a retornar la concentración de glucosa en la sangre a su valor normal.

Otras presiones selectivas deben haber operado también a lo largo de la evolución, seleccionando mecanismos reguladores que consigan lo siguiente:

1. Maximizar la eficiencia en la utilización de combustibles impidiendo la operación simultánea de rutas en direcciones opuestas (tales como glucólisis y gluconeogénesis).
2. Distribuir los metabolitos adecuadamente entre rutas alternativas (tales como glucólisis y ruta de las pentosas fosfato).
3. Utilizar el combustible mejor adaptado a las necesidades inmediatas del organismo (glucosa, ácidos grasos, glucógeno o aminoácidos).
4. Enlentecer las rutas biosintéticas cuando se acumulan sus productos.

Los siguientes capítulos de este libro presentan muchos ejemplos de cada tipo de mecanismo regulador.

RESUMEN 15.1 Regulación de las rutas metabólicas

- En una célula metabólicamente activa en estado estacionario, los intermediarios se forman y consumen a velocidades iguales. Cuando una perturbación transitoria altera la velocidad de formación o consumo de un metabolito, variaciones compensatorias en las actividades enzimáticas devuelven el sistema al estado estacionario.
- Las células regulan su metabolismo mediante diferentes mecanismos que actúan en una escala de tiempo que varía de menos de un milisegundo a días, bien sea cambiando la actividad de moléculas enzimáticas ya existentes, bien sea variando el número de moléculas de un determinado enzima específico.
- Diversas señales activan o inactivan factores de transcripción que actúan en el núcleo para regular la expresión génica. Los cambios en el transcriptoma conducen a cambios en el proteoma y finalmente en el metaboloma de una célula o tejido.
- En procesos con múltiples etapas tales como la glucólisis, ciertas reacciones están esencialmente en el equilibrio durante el estado estacionario; las velocidades de estas reacciones aumentan o disminuyen con la concentración de sustrato. Otras reacciones se encuentran lejos del equilibrio; estas reacciones son con frecuencia los puntos en los que se regula globalmente la ruta.
- Mecanismos reguladores mantienen niveles casi constantes de metabolitos clave tales como ATP y NADH en las células y la glucosa en la sangre, al tiempo que adaptan la utilización o almacenamiento de glucosa a las necesidades cambiantes del organismo.
- Los niveles de ATP y AMP son un reflejo sensible del estatus energético de una célula de modo que cuando disminuye la razón [ATP]/[AMP], la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) desencadena diversas respuestas celulares para aumentar [ATP] y disminuir [AMP].

15.2 Análisis del control metabólico

Eduard Buchner, 1860–1917

Los estudios detallados de la regulación metabólica no eran factibles hasta que no se habían clarificado los pasos químicos básicos de una ruta y se habían caracterizado los enzimas responsables. Empezando con el descubrimiento por Eduard Buchner (alrededor de 1900) de que un extracto de células de levadura rotas podían convertir la glucosa en etanol y CO_2, uno de los esfuerzos principales de la investigación bioquímica fue deducir las etapas mediante las que tenía lugar esta transformación así como la purificación y caracterización de los enzimas que catalizan cada paso. A mitad del siglo XX se habían purificado y caracterizado los diez enzimas de la ruta glucolítica. En los siguientes 50 años se conocieron muchos detalles sobre la regulación de estos enzimas por señales intra y extracelulares, a través de los mecanismos alostéricos y covalentes descritos en este capítulo. La sabiduría convencional era que en una ruta lineal tal como la glucólisis, la catálisis por un enzima ha de ser la más lenta y debe determinar, por tanto, la velocidad del flujo de metabolitos, o flujo, a través de la vía completa. En el caso de la glucólisis se consideraba que la PFK-1 era el enzima limitante de velocidad ya que se sabía que era regulado estrechamente por la fructosa 2,6-bisfosfato y otros efectores alostéricos.

Con la llegada de la tecnología de la ingeniería genética fue posible probar esta hipótesis de "un único paso limitante de velocidad" al incrementar la concentración del enzima que cataliza el "paso limitante de velocidad" de la ruta y determinar si el flujo a través de la misma aumentaba de manera proporcional. En una mayoría de casos se vio que eso no era así: la solución sencilla (un solo paso determinante de velocidad) era falsa. Está claro en la actualidad que en la mayoría de rutas el control del flujo se distribuye entre varios enzimas y que el grado con el que cada uno contribuye al control varía según las circunstancias metabólicas tales como suministro de material de partida (por

ejemplo, glucosa), suministro de oxígeno, necesidad de otros productos procedentes de intermediarios de la ruta (por ejemplo, glucosa 6-fosfato para la ruta de las pentosas fosfato en la células que sintetizan grandes cantidades de nucleótidos), los efectos de metabolitos con papeles reguladores y el estatus hormonal del organismo (tales como los niveles de insulina y de glucagón), entre otros factores.

¿Por qué estamos interesados en qué es lo que limita el flujo a través de una ruta? Para comprender la acción de las hormonas o de los medicamentos, o la patología resultante de un fallo de la regulación metabólica, hemos de saber dónde se ejerce el control. Si los investigadores desean desarrollar un fármaco que estimula o inhibe una ruta, la diana lógica es el enzima que tiene un impacto mayor sobre aquella ruta. Por otro lado, la bioingeniería de un microorganismo para producir grandes cantidades de un producto de valor comercial (p. 312) requiere un conocimiento de lo que limita el flujo de metabolitos hacia tal producto.

Se puede medir experimentalmente la contribución de cada enzima al flujo a través de la ruta

Existen diversas maneras de determinar experimentalmente de qué forma un cambio en la actividad de un enzima de una ruta afecta el flujo de metabolitos a través de la misma. Consideremos los resultados experimentales que se muestran en la **Figura 15–7**. Cuando se homogenó una muestra de hígado de rata para liberar todos los enzimas solubles, el extracto llevó a cabo la conversión glucolítica de la glucosa en fructosa 1,6-bisfosfato a una velocidad que se podía medir. (Por cuestión de simplicidad este experimento se centró solamente en la primera parte de la ruta glucolítica.) Cuando se añadieron cantidades crecientes de hexoquinasa IV (glucoquinasa) purificada al extracto, la velocidad de la glucólisis aumentó progresivamente. La adición de PFK-1 purificada al extracto también aumentó la velocidad de la glucólisis pero no de una forma tan espectacular como sucedía con la hexoquinasa. La adición de fosfohexosa isomerasa no tuvo ningún efecto. Estos resultados sugieren que tanto la hexoquinasa como la PFK-1 contribuyen a establecer el flujo a través de la ruta (la hexoquinasa más que la PFK-1) mientras que la fosfohexosa isomerasa no contribuye al mismo.

Pueden realizarse experimentos similares con células u organismos intactos, utilizando inhibidores o activadores específicos para modificar la actividad de un enzima al tiempo que se observa el efecto sobre el flujo a través de la ruta. La cantidad de un enzima puede también alterarse genéticamente; la bioingeniería puede producir una célula que sintetiza copias extra del enzima que se está investigando o que tiene una versión menos activa del enzima que la normal. El aumento de la concentración de un enzima mediante técnicas genéticas tiene a veces efectos significativos sobre el flujo aunque a veces no se observa ningún efecto.

Existen tres parámetros críticos que, conjuntamente, describen la capacidad de respuesta de una ruta a cambios en las circunstancias metabólicas y que son el núcleo del **análisis del control metabólico.** Daremos ahora una descripción cualitativa de estos parámetros y de su significado en el contexto de una célula viva. En el Recuadro 15–1 proporcionaremos una discusión cuantitativa más rigurosa.

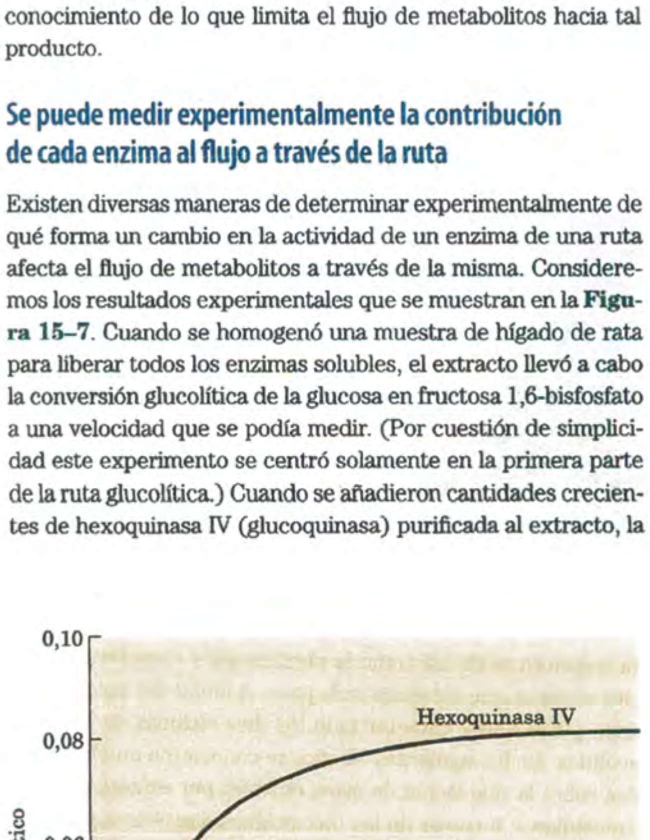


FIGURA 15–7 Dependencia del flujo glucolítico en un homogenado de hígado de rata tras la adición de enzimas. Se añadieron enzimas purificados en las cantidades que muestra el eje de abscisas a un extracto de hígado que llevaba a cabo la glucólisis in vitro. En el eje de ordenadas se muestra el aumento del flujo a través de la ruta.

El coeficiente de control cuantifica el efecto de un cambio en una actividad enzimática sobre el flujo metabólico a través de una ruta

Datos cuantitativos sobre el flujo metabólico, obtenidos de la forma descrita en la Figura 15–7, se pueden utilizar para calcular un **coeficiente de control de flujo, *C*,** para cada enzima de una ruta. Este coeficiente expresa la contribución relativa de cada enzima en el establecimiento de la velocidad a la que fluyen los metabolitos a través de la ruta, es decir, el **flujo, *J*.** *C* puede tener cualquier valor desde 0,0 (para un enzima sin impacto sobre el flujo) hasta 1,0 (para un enzima que determina completamente el flujo). Un enzima también puede tener un coeficiente de control de flujo *negativo*. En una ruta ramificada, un enzima de una rama, al drenar intermediarios fuera de la otra rama, puede tener un impacto negativo sobre el flujo a través de la otra rama (**Fig. 15–8**). *C* no es una constante, y no es intrín-

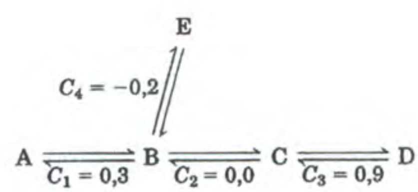


FIGURA 15–8 Coeficiente de control de flujo, *C*, en una ruta metabólica ramificada. En esta ruta sencilla, el intermediario B tiene dos destinos alternativos. En la medida que la reacción B ⟶ E elimina B de la ruta A ⟶ D, controla esta ruta, lo que da como resultado un coeficiente de control de flujo *negativo* para el enzima que cataliza el paso B ⟶ E. Observe que la suma de los cuatro coeficientes es igual a 1,0 como ha de ser.

RECUADRO 15–1 MÉTODOS Análisis del control metabólico: aspectos cuantitativos

Se pueden determinar cuantitativamente los factores que influyen en el paso de intermediarios (flujo) a través de una ruta mediante experimentos y expresarse en términos útiles para predecir el cambio en el flujo cuando cambia algún factor implicado en la ruta. Considere la simple secuencia de reacciones de la Figura 1, en la que un sustrato X, por ejemplo glucosa, se convierte en varios pasos en el producto Z (quizá el piruvato formado glucolíticamente). Un enzima posterior de la ruta es una deshidrogenasa (ydh) que actúa sobre el sustrato Y. Dado que es fácil medir la acción de una deshidrogenasa (véase la Fig. 13–24), podemos utilizar el flujo (J) a través de este paso (J_{ydh}) para medir el flujo a través de la totalidad de la ruta. Manipulamos experimentalmente la concentración de un enzima anterior de la ruta (xasa, que actúa sobre el sustrato X) y medimos el flujo a través de la ruta (J_{ydh}) para diversas concentraciones del enzima xasa.

La relación entre el flujo a través de la ruta desde X a Z en la célula intacta y la concentración de cada enzima de la ruta debería ser hiperbólica virtualmente sin flujo a una concentración infinitamente baja de enzima y flujo próximo al máximo a una actividad enzimática muy elevada. En una gráfica de J_{ydh} frente a la concentración de xasa, E_{xasa}, la variación de flujo con un pequeño cambio de enzima es $\partial J_{ydh}/\partial E_{xasa}$, la cual es simplemente la pendiente de la tangente a la curva a cualquier concentración del enzima, E_{xasa}, y que tiende a cero a E_{xasa} saturante. A baja E_{xasa} la pendiente es abrupta; el flujo aumenta con cada incremento de la actividad enzimática. A una E_{xasa} muy elevada la pendiente es mucho menor; el sistema es menos sensible a la xasa adicionada porque ya está presente en exceso sobre el resto de enzimas de la ruta.

Para mostrar cuantitativamente la dependencia del flujo a través de la ruta, ∂J_{ydh} respecto a ∂E_{xasa}, podríamos utilizar la razón $\partial J_{ydh}/\partial E_{xasa}$. Sin embargo, su utilidad es limitada, ya que su valor depende de las unidades utilizadas para expresar el flujo y la actividad enzimática. Si expresamos las variaciones *fraccionales* en flujo y actividad enzimática, $\partial J_{ydh}/J_{ydh}$, y $\partial E_{xasa}/E_{xasa}$, obtenemos una expresión adimensional para el **coeficiente del control de flujo,** C, $C^{J_{ydh}}_{xasa}$:

$$C^{J_{ydh}}_{xasa} \approx \frac{\partial J_{ydh}}{J_{ydh}} \bigg/ \frac{\partial E_{xasa}}{E_{xasa}} \qquad (1)$$

que se puede reordenar

$$C^{J_{ydh}}_{xasa} \approx \frac{\partial J_{ydh}}{\partial E_{xasa}} \cdot \frac{E_{xasa}}{J_{ydh}}$$

que es matemáticamente idéntica a

$$C^{J_{ydh}}_{xasa} \approx \frac{\partial \ln J_{ydh}}{\partial \ln E_{xasa}}$$

Esta ecuación sugiere una forma gráfica sencilla para determinar el coeficiente de control de flujo: $C^{J_{ydh}}_{xasa}$ es la pendiente de la tangente en la gráfica de $\ln J_{ydh}$ frente a $\ln E_{xasa}$, que puede obtenerse al volver a representar los datos de la Figura 2a para obtener la Figura 2b. Observe que $C^{J_{ydh}}_{xasa}$ no es una constante;

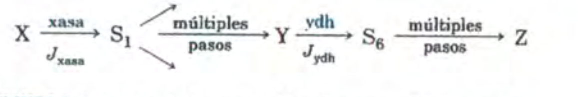


FIGURA 1 Flujo a través de una ruta hipotética con múltiples enzimas.

depende de la E_{xasa} inicial a partir del que tiene lugar el cambio en la concentración de enzima. Para los casos mostrados en la Figura 2, $C^{J_{ydh}}_{xasa}$ se encuentra alrededor de 1,0 a la E_{xasa} más baja pero sólo alrededor de 0,2 a elevada E_{xasa}. Un valor de $C^{J_{ydh}}_{xasa}$ próximo a 1,0 significa que la concentración del enzima determina completamente el flujo a través de la ruta; un valor próximo a 0,0 significa que la concentración del enzima no limita el flujo a través de la ruta. A menos que el coeficiente de control de flujo sea superior a aproximadamente 0,5, las variaciones en la actividad del enzima no tendrán un efecto importante sobre el flujo.

La **elasticidad,** ε, de un enzima es una medida de cómo cambia la actividad catalítica de ese enzima cuando varía la concentración de un metabolito ya sea sustrato, producto o efector. Se obtiene a partir de una gráfica experimental de la velocidad de la reacción catalizada por el enzima frente a la concentración del metabolito a las concentraciones de metabolito que se encuentran en la célula. Mediante argumentos análogos a los utilizados para obtener C, podemos demostrar que ε es la pendiente de la tangente en una gráfica de $\ln V$ frente $\ln$ [sustrato, producto o efector]:

$$\varepsilon^{xasa}_{S} = \frac{\partial V_{xasa}}{\partial S} \cdot \frac{S}{V_{xasa}}$$

$$= \frac{\partial \ln |V_{xasa}|}{\partial \ln S}$$

Para un enzima con cinética de Michaelis-Menten típica, el valor de ε va desde alrededor de 1 para concentraciones de sustrato muy por debajo de la K_m hasta cerca de 0 a medida que se aproxima a V_{max}. Los enzimas alostéricos pueden tener elasticidades superiores a 1,0 pero no superiores a su coeficiente de Hill (p. 164).

Finalmente, el efecto de controladores fuera de la propia ruta (es decir, no metabolitos) se puede medir y expresar como **coeficiente de respuesta, *R*.** Se mide la variación en el flujo a través de la ruta cuando se hace variar la concentración del parámetro controlador P, y se define R de forma análoga a la de la Ecuación 1, lo que da la expresión

$$R^{J_{ydh}}_{P} = \frac{\partial J_{ydh}}{\partial P} \cdot \frac{P}{J_{ydh}}$$

Utilizando la misma lógica y métodos gráficos descritos antes para determinar C, podemos obtener R como pendiente de la tangente de la gráfica de $\ln J$ frente a $\ln P$.

Los tres coeficientes que hemos descrito se relacionan de una forma sencilla:

$$R^{J_{ydh}}_{P} = C^{J_{ydh}}_{xasa} \cdot \varepsilon^{xasa}_{P}$$

(continúa en la página siguiente)

RECUADRO 15–1 MÉTODOS Análisis del control metabólico: aspectos cuantitativos (*continuación de la página anterior*)

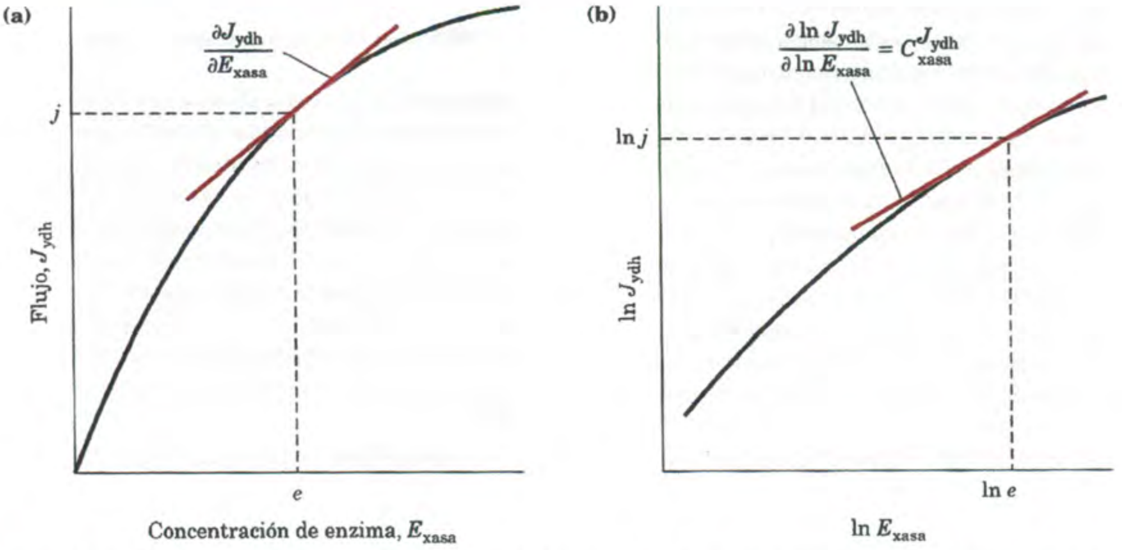


FIGURA 2 Coeficiente de control de flujo. **(a)** Variación típica del flujo de la ruta, J_{ydh}, medida en el paso catalizado por el enzima ydh, en función de la cantidad del enzima xasa, E_{xasa}, que cataliza una etapa anterior de la ruta. El coeficiente de control de flujo a (*e,j*) es la pendiente del producto de la tangente a la curva, $\partial J_{ydh}/\partial E_{xasa}$, y la razón (factor de escalado), *e/j*. **(b)** En una gráfica bilogarítmica de la misma curva, el coeficiente de control de flujo es la pendiente de la tangente a la curva.

Así pues, la sensibilidad de cada enzima de una ruta a una variación en un factor controlador externo es una función sencilla de dos parámetros diferentes: el coeficiente de control, una variable que expresa el grado con el que el enzima influye en el flujo bajo un conjunto determinado de condiciones, y la elasticidad, una propiedad intrínseca del enzima que refleja la sensibilidad de dicho enzima a las concentraciones de sustrato y de efector.

seco para un único enzima; es una función de todo el sistema de enzimas y su valor depende de las concentraciones de sustratos y efectores.

Cuando se sometieron datos reales del experimento sobre la glucólisis en un extracto de hígado de rata (Fig. 15–7) a este tipo de análisis, se encontraron los siguientes coeficientes de control de flujo (para enzimas a las concentraciones presentes en el extracto): 0,79 para la hexoquinasa, 0,21 para la PFK-1 y 0,0 para la fosfohexosa isomerasa. No es una casualidad que la suma de estos valores sea 1,0; podemos demostrar que para cualquier ruta completa la suma de los coeficientes de control de flujo debe ser igual a la unidad.

El coeficiente de elasticidad está relacionado con la sensibilidad de un enzima a cambios en la concentración de metabolito o de regulador

Un segundo parámetro, el denominado **coeficiente de elasticidad, ε,** expresa cuantitativamente la sensibilidad de un enzima a variaciones en la concentración de un metabolito o de un regulador; es una función de las propiedades cinéticas intrínsecas del enzima. Por ejemplo, un enzima que sigue la cinética de Michaelis-Menten típica muestra una respuesta hiperbólica al aumento en la concentración de sustrato **(Fig. 15–9)**. A bajas concentraciones de sustrato (por ejemplo, 0,1 K_m), cada incremento en la concentración de sustrato

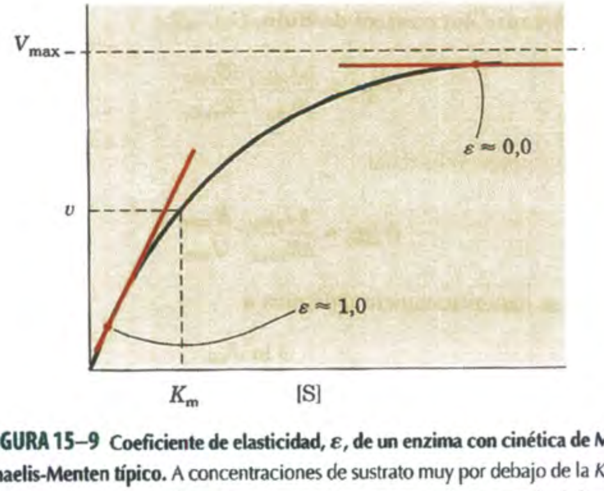


FIGURA 15–9 Coeficiente de elasticidad, ε, de un enzima con cinética de Michaelis-Menten típico. A concentraciones de sustrato muy por debajo de la K_m, cada incremento en la [S] produce un cambio correspondiente grande de la velocidad de reacción, *v*. Para esta región de la curva el enzima tiene un ε de alrededor de 1,0. A [S] $\gg$ K_m, el incremento de [S] tiene poco efecto sobre *v*; aquí ε es próximo a 0,0.

da lugar a un aumento comparable en la actividad enzimática, dando un ε próximo a 1,0. A concentraciones de sustrato relativamente elevadas (por ejemplo, 10 K_m), el incremento en la concentración de sustrato tiene poco efecto sobre la velocidad de reacción debido a que el enzima ya se encuentra saturado con sustrato. La elasticidad en este caso se aproxima a cero. Para los enzimas alostéricos que muestran cooperatividad positiva, ε puede ser superior a 1,0 si bien no puede superar el coeficiente de Hill. Recuérdese que el coeficiente de Hill, normalmente adopta valores de entre 1,0 y 4,0.

El coeficiente de respuesta expresa el efecto de un controlador externo sobre el flujo a través de una ruta

También podemos deducir una expresión cuantitativa para el impacto relativo de un factor externo (tal como una hormona o factor de crecimiento), que no es ni un metabolito ni un enzima de la ruta, sobre el flujo a través de la ruta. El experimento mediría el flujo a través de la ruta (glucólisis en este caso) a varios niveles del parámetro P (por ejemplo, la concentración de insulina) para obtener el **coeficiente de respuesta, *R*,** que expresa el cambio en el flujo de la ruta cuando cambia P ([insulina]).

Los tres coeficientes, C, ε y R están relacionados de una manera sencilla: la sensibilidad (R) de una ruta a un factor externo que afecta a un enzima determinado es función de (1) la sensibilidad de la ruta a cambios en la actividad de aquel enzima (el coeficiente de control, C) y (2) la sensibilidad de tal enzima específico a cambios en el factor de control externo (la elasticidad, ε):

$$R = C \cdot \varepsilon$$

Se puede examinar de esta manera cada enzima de la ruta y determinar separadamente los efectos de cualquiera de los factores externos sobre el flujo a través de la ruta. Así, en principio, podemos predecir de qué modo variará el flujo de sustrato a través de una serie de pasos enzimáticos cuando se produce un cambio en uno o más factores de control fuera de la ruta. En el Recuadro 15–1 se muestra el tratamiento cuantitativo de estos conceptos cualitativos.

El análisis del control metabólico se ha aplicado al metabolismo glucídico con resultados sorprendentes

El análisis del control metabólico proporciona un marco dentro del cual podemos pensar cuantitativamente acerca de la regulación, interpretar el significado de las propiedades reguladoras de cada enzima de una ruta, identificar los pasos que más afectan al flujo a través de la ruta y distinguir entre mecanismos *reguladores* que actúan para mantener la concentración de los metabolitos y mecanismos de *control* que, de hecho, alteran el flujo a través de la ruta. Por ejemplo, el análisis de la ruta glucolítica en la levadura ha revelado la existencia de un coeficiente de control de flujo inesperadamente bajo para la PFK-1, el cual, como ya hemos comentado, había sido considerada como el principal punto de control, el "paso limitante de velocidad", de la glucólisis. La elevación experimental de la concentración de PFK-1 en un factor de cinco condujo a un cambio en el flujo a través de la glucólisis de menos del 10%, lo que sugirió que el papel real de la regulación por la PFK-1 no es controlar el flujo a través de la glucólisis sino intervenir en la homeostasis de metabolitos con el fin de impedir grandes cambios en las concentraciones de metabolitos cuando el flujo a través de la glucólisis aumenta como respuesta a elevadas concentraciones de glucosa o insulina en la sangre. Recuérdese que el estudio de la glucólisis en un extracto de hígado (Fig. 15–7) también proporcionó un coeficiente de control de flujo que contradecía el conocimiento convencional; mostró que la hexoquinasa, no la PFK-1, tenía más influencia en el establecimiento del flujo a través de la glucólisis. Tenemos que indicar aquí que un extracto de hígado está muy lejos de ser el equivalente de un hepatocito; la forma ideal de estudiar el control de flujo es manipulando un único enzima cada vez en la célula viva. Esto ya es factible en muchos casos.

Se ha utilizado la resonancia magnética nuclear (RMN) como método no invasivo para determinar la concentración de glucógeno y metabolitos en la ruta de cinco pasos que va de la glucosa en la sangre al glucógeno en los miocitos **(Fig. 15–10)** de músculo humano y de rata. Se encontró que el coeficiente de control de flujo para la glucógeno sintasa era menor que el de los pasos catalizados por el transportador de glucosa y la hexoquinasa. (La glucógeno sintasa y otros enzimas del metabolismo del glucógeno se discuten en las Secciones 15.4 y 15.5.) Este hallazgo contradice la idea aceptada convencionalmente de que la glucógeno sintasa es el sitio de control del flujo y sugiere que la importancia de la fosforilación /desfosforilación de la glucógeno sintasa está, contrariamente, relacionada con el mantenimiento de la homeostasis de metabolitos, es decir, *regulación* y no *control*. Dos metabolitos de esta ruta, glucosa y glucosa 6-fosfato, son intermediarios clave de otras rutas, entre ellas la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la síntesis de glucosamina.

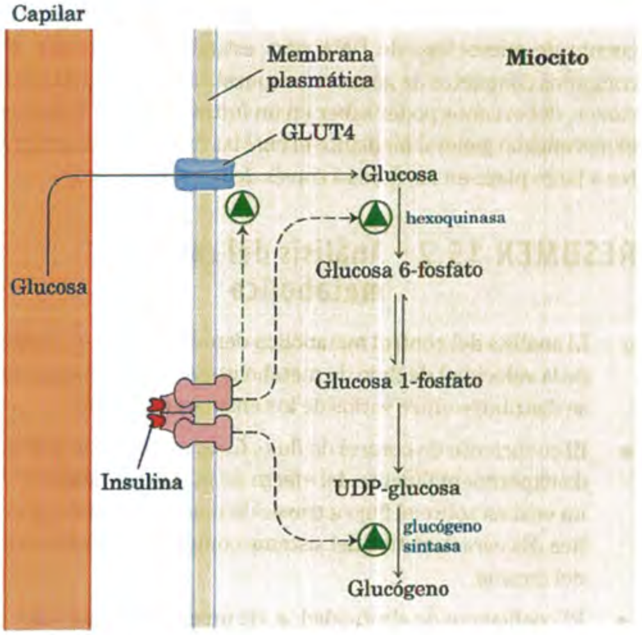


FIGURA 15–10 Control de la síntesis de glucógeno en el músculo por la glucosa sanguínea. La insulina tiene un efecto sobre tres de los cinco pasos de esta ruta pero son los efectos sobre el transporte y la actividad hexoquinasa, no el cambio en la actividad glucógeno sintasa, los que hacen aumentar el flujo hacia el glucógeno.

El análisis del control metabólico sugiere que cuando aumenta la concentración de glucosa en la sangre, la insulina actúa sobre el músculo para (1) aumentar el transporte de glucosa a las células incorporando GLUT4 a la membrana plasmática, (2) inducir la síntesis de hexoquinasa y (3) activar la glucógeno sintasa por alteración covalente (Fig. 15–39). Los dos primeros efectos de la insulina aumentan el flujo de glucosa a través de la ruta (control) y el tercero sirve para adaptar la actividad de la glucógeno sintasa de modo que las concentraciones de metabolitos (glucosa 6-fosfato, por ejemplo) no cambien de manera espectacular con el aumento de flujo (regulación).

El análisis del control metabólico sugiere un método general para incrementar el flujo a través de una ruta

¿Cómo se podría modificar una célula para incrementar el flujo a través de una ruta sin alterar la concentración de otros metabolitos o los flujos a través de otras rutas? Hace más de tres décadas que Henrik Kacser predijo, sobre la base del análisis del control metabólico, que esto se podría conseguir incrementando las concentraciones de todos los enzimas de la ruta. La predicción se ha confirmado en diversas pruebas experimentales a la vez que también coincide con la forma en la que, normalmente, las células controlan flujos a través de una ruta. Por ejemplo, cuando se suministra a las ratas una dieta de alto contenido proteico, eliminan el exceso de grupos amino convirtiéndolos en urea en el ciclo de la urea (Capítulo 18). Después de tal modificación en la dieta, la eliminación de urea aumenta cuatro veces y la cantidad de los ocho enzimas del ciclo de la urea aumenta de dos a tres veces. De modo parecido, cuando se desencadena un aumento de la oxidación de ácidos grasos por el receptor γ de los peroxisomas activado por proliferador (PPARγ, un factor de transcripción activado por ligando; véase la Fig. 21–22), se aumenta la síntesis del *conjunto completo* de enzimas oxidativos de los ácidos grasos. Con la utilización cada vez más frecuente de microchips de DNA para estudiar la expresión de conjuntos completos de genes en respuesta a diversas perturbaciones, deberíamos poder saber en un futuro próximo si éste es el mecanismo general mediante el cual las células realizan ajustes a largo plazo en los flujos a través de rutas específicas.

RESUMEN 15.2 Análisis del control metabólico

- El análisis del control metabólico demuestra que el control de la velocidad de flujo de metabolitos a través de una ruta se distribuye entre varios de los enzimas de la ruta.
- El coeficiente de control de flujo, C, es una medida obtenida experimentalmente del efecto de la concentración de un enzima sobre el flujo a través de una ruta multienzimática. Es característico del sistema completo y no intrínseco del enzima.
- El coeficiente de elasticidad, ε, de un enzima es un valor obtenido experimentalmente sobre su sensibilidad a cambios en la concentración de un metabolito o de una molécula reguladora.
- El coeficiente de respuesta, R, es la expresión del cambio del flujo a través de una ruta, determinado experimentalmente, en respuesta a una hormona o aun segundo mensajero reguladores. El coeficiente de respuesta es función de C y ε: $R = C \cdot \varepsilon$.
- Algunos enzimas regulados controlan el flujo a través de una ruta, mientras que otros reequilibran la concentración de metabolitos en respuesta a un cambio en el flujo. La primera actividad es el *control*; la segunda, la actividad reequilibradora, es la *regulación*.
- El análisis del control metabólico predice, y los experimentos lo han confirmado, que la manera más efectiva para incrementar el flujo hacia un producto específico es aumentar la concentración de todos los enzimas de la ruta.

15.3 Regulación coordinada de la glucólisis y la gluconeogénesis

En los mamíferos la **gluconeogénesis** tiene lugar principalmente en el hígado y su misión es proporcionar glucosa para exportarla a otros tejidos cuando se han agotado los depósitos de glucógeno y cuando no se encuentra disponible la glucosa de la dieta. Tal como se discutió en el Capítulo 14, la gluconeogénesis utiliza varios de los enzimas que actúan en la glucólisis, pero no es simplemente la inversa de la glucólisis. Siete de las reacciones glucolíticas son libremente reversibles y los enzimas que catalizan estas reacciones también funcionan en la gluconeogénesis **(Fig. 15–11)**. Tres reacciones de la glucólisis son tan exergónicas que son prácticamente irreversibles: las catalizadas por la hexoquinasa, por la PFK-1 y por la piruvato quinasa. Las tres reacciones presentan una $\Delta G'$ grande y negativa (la Tabla 15–3 muestra los valores en el músculo cardíaco). En la gluconeogénesis se utilizan rodeos para cada uno de estos pasos irreversibles. Por ejemplo, la conversión de fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato está catalizada por la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1). Cada una de estas reacciones de rodeo tiene también una $\Delta G'$ negativa y grande.

En cada uno de los tres pasos en los que las reacciones glucolíticas están rodeadas por reacciones gluconeogénicas alternativas, la operación simultánea de ambas rutas consumiría ATP sin que se consiguiese ningún trabajo químico o biológico. Por ejemplo, la PFK-1 y la FBPasa-1 catalizan las reacciones opuestas:

$$\text{ATP + fructosa 6-fosfato} \xrightarrow{\text{PFK-1}} \text{ADP + fructosa 1,6-bisfosfato}$$

$$\text{Fructosa 1,6-bisfosfato} + H_2O \xrightarrow{\text{FBPasa-1}} \text{fructosa 6-bisfosfato + P}$$

La suma de estas dos reacciones es:

$$\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i + \text{calor}$$

esto es, hidrólisis de ATP sin que se produzca ningún trabajo metabólico útil. Está claro que si se permitiese que estas dos reacciones tuviesen lugar de manera simultánea a una velocidad elevada en la misma célula, se disiparía una gran cantidad de energía en forma de calor. Este proceso tan poco económico se ha denominado **ciclo inútil.** Sin embargo, tal como veremos más adelante, tales ciclos pueden proporcio-

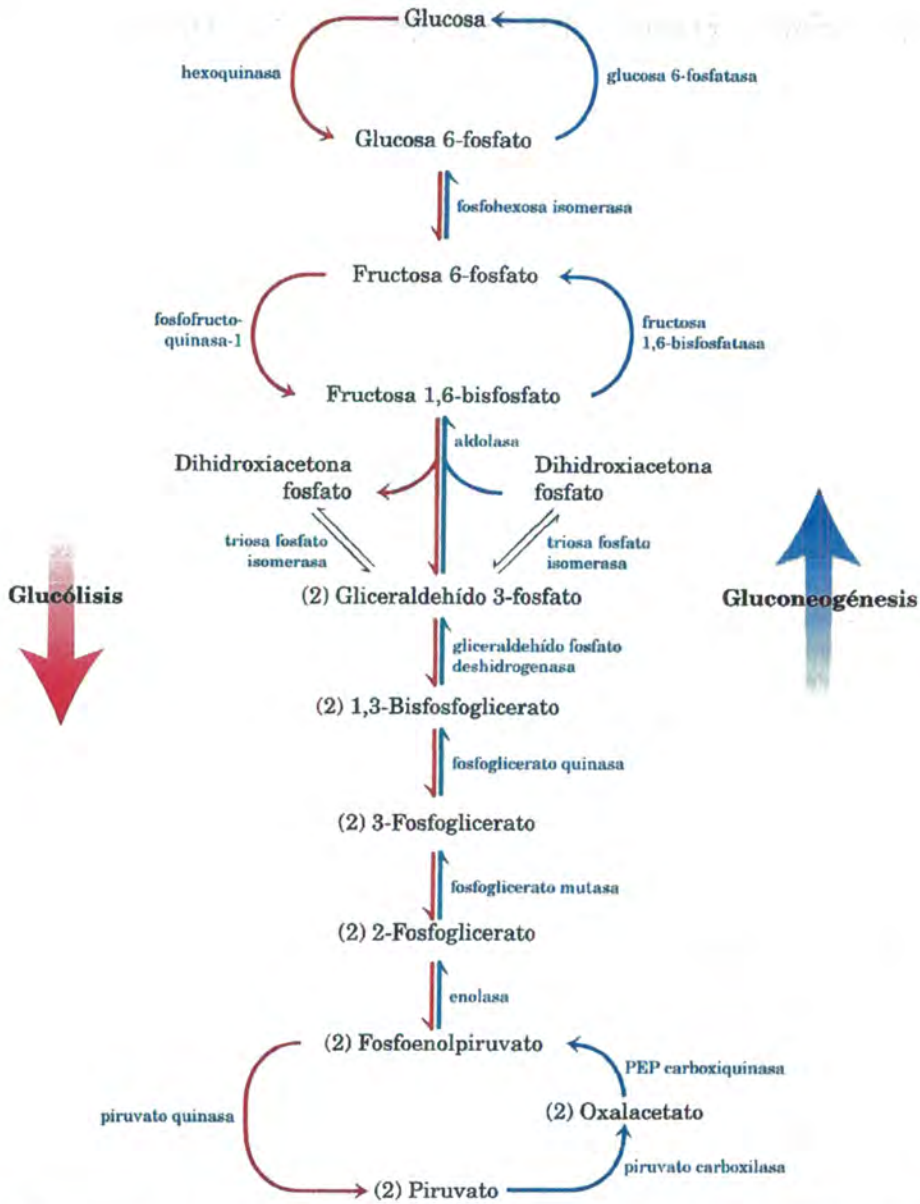


FIGURA 15–11 Glucólisis y gluconeogénesis. Rutas opuestas de la glucólisis (rosa) y gluconeogénesis (azul) en el hígado de rata. Tres pasos están catalizados por enzimas diferentes en la gluconeogénesis (las "reacciones de rodeo") y en la glucólisis; siete pasos están catalizados por los mismos enzimas en las dos vías. Se han omitido los cofactores por razones de claridad.

nar ventajas para controlar rutas, con lo que el término **ciclo del sustrato** constituye una descripción más adecuada. Ciclos de sustrato similares también tienen lugar con los dos restantes conjuntos de reacciones de rodeo de la gluconeogénesis (Fig. 15–11)

Analizamos ahora los mecanismos que regulan la glucólisis y la gluconeogénesis en los tres puntos en los que las rutas son diferentes.

Los isozimas de la hexoquinasa de músculo y de hígado están afectados de forma diferente por su producto, la glucosa 6-fosfato

La hexoquinasa, que cataliza la entrada de glucosa a la ruta glucolítica, es un enzima regulador. En los seres humanos existen cuatro isozimas (designados I a IV) codificados por cuatro genes diferentes que catalizan la misma reacción (Recuadro 15–2). El isozima predominante de la hexoquinasa de los miocitos (**hexoquinasa II**) tiene una elevada afinidad por la glucosa (está semisaturada a 0,1 mM aproximadamente). Debido a que la glucosa que entra en los miocitos proveniente de la sangre (en la que la concentración de glucosa es de 4 a 5 mM) produce una concentración intracelular de glucosa suficientemente elevada para saturar la hexoquinasa II, el enzima actúa normalmente a su velocidad máxima o prácticamente. La **hexoquinasa I** y la hexoquinasa II musculares son inhibidas alostéricamente por su producto glucosa 6-fosfato, por lo que siempre que la concentración de glucosa 6-fosfato celular se eleva por encima de su nivel normal estos isozimas son inhibidos temporal y reversiblemente, equilibrando la velocidad de

RECUADRO 15–2 Isozimas: proteínas diferentes que catalizan la misma reacción

Las cuatro formas de la hexoquinasa encontradas en tejidos de mamíferos no son sino un ejemplo de una situación biológica común: la misma reacción catalizada por dos o más formas moleculares de un enzima. Estas formas múltiples, denominadas isozimas o isoenzimas, pueden presentarse en la misma especie, en el mismo tejido o incluso en la misma célula. Las diferentes formas (isoformas) del enzima generalmente difieren en sus propiedades cinéticas o reguladoras, en el cofactor que utilizan (por ejemplo, NADH o NADPH en los isozimas de las deshidrogenasas) o en su distribución subcelular (solubles o ligados a membrana). Los isozimas pueden tener secuencias de aminoácidos similares, pero no idénticas, y en muchos casos comparten claramente un origen evolutivo común.

Uno de los primeros enzimas de los que se encontró que tenían isozimas fue la lactato deshidrogenasa (LDH; p. 547) la cual, en tejidos de vertebrados, existe en al menos cinco isozimas diferentes que se pueden separar por electroforesis. Todos los isozimas de la LDH contienen cuatro cadenas polipeptídicas (cada una de ellas con una M_r de 33.500) y cada tipo contiene una proporción diferente de dos clases de polipéptidos. La cadena M (de músculo) y la cadena H (de "heart", corazón) están codificadas por dos genes diferentes.

En el músculo esquelético el isozima predominante contiene cuatro cadenas M, mientras que en el corazón el predominante contiene cuatro cadenas H. Otros tejidos tienen alguna combinación de los cinco tipos posibles de isozimas de la LDH:

Tipo	Composición	Localización
LDH_1	HHHH	Corazón y eritrocito
LDH_2	HHHM	Corazón y eritrocito
LDH_3	HHMM	Cerebro y riñón
LDH_4	HMMM	Músculo esquelético e hígado
LDH_5	MMMM	Músculo esquelético e hígado

Las diferencias en el contenido de isozimas de los tejidos pueden utilizarse para evaluar el momento y extensión de una lesión cardíaca debida a un infarto de miocardio (ataque de corazón). La lesión de los tejidos cardíacos da lugar a la liberación de LDH del corazón a la sangre. Poco después de un ataque de corazón, la concentración total de LDH sanguínea aumenta, habiendo más LDH_2 que LDH_1. Transcurridas 12 horas las cantidades de LDH_1 y LDH_2 son muy similares y después de 24 horas hay más LDH_1 que LDH_2. Este cambio en la proporción $[LDH_1]/[LDH_2]$, junto con el aumento en sangre de otro enzima, la creatina quinasa, son prueba muy importante de la existencia de un infarto de miocardio reciente. ■

Los diferentes isozimas de la LDH tienen valores significativamente diferentes de V_{max} y K_m, especialmente respecto al piruvato. Las propiedades de la LDH_4 favorecen la reducción rápida a lactato de concentraciones muy bajas de piruvato en el músculo esquelético, mientras que por su parte las del isozima LDH_1 favorecen la rápida oxidación del lactato a piruvato en el corazón.

En general, la distribución de los diferentes isozimas de un enzima determinado refleja al menos cuatro factores:

1. *Diferentes patrones metabólicos en órganos diferentes.* En el caso de la glucógeno fosforilasa, los isozimas del músculo esquelético y del hígado tienen diferentes propiedades reguladoras, lo que es reflejo de los diferentes papeles de la degradación del glucógeno en estos dos tejidos.
2. *Diferentes localizaciones y papeles metabólicos de los isozimas de la misma célula.* Un ejemplo de esto son los isozimas de la citrato deshidrogenasa del citosol y de la mitocondria (Capítulo 16).
3. *Diferentes etapas del desarrollo en tejidos embrionarios o fetales y en los tejidos adultos.* Por ejemplo, el hígado fetal tiene una distribución característica de los isozimas de la LDH que cambia cuando el órgano se desarrolla a su forma adulta. Algunos enzimas del catabolismo de la glucosa en células malignas (cancerosas) se presentan en su forma isozimática fetal y no la adulta.
4. *Diferentes respuestas de isozimas a moduladores alostéricos.* Esta diferencia es útil en el ajuste fino de las velocidades metabólicas. La hexoquinasa IV (glucoquinasa) del hígado y los isozimas de la hexoquinasa de otros tejidos difieren en su sensibilidad a la inhibición por glucosa 6-fosfato.

formación de glucosa 6-fosfato con la velocidad de su utilización y restableciendo el estado estacionario.

Los diferentes isozimas de la hexoquinasa de hígado y músculo reflejan el papel diferente de estos órganos en el metabolismo de los glúcidos: el músculo consume glucosa, utilizándola para la producción de energía, mientras que el hígado mantiene la homeostasis de la glucosa eliminando o produciendo glucosa según sea la concentración de glucosa dominante. El isozima de la hexoquinasa predominante en el hígado es la **hexoquinasa IV** (glucoquinasa), que difiere en tres aspectos importantes de las hexoquinasas I–III musculares. En primer lugar, la concentración de glucosa a la que la hexoquinasa IV está semisaturada (alrededor de 10 mM) es superior a la concentración usual de glucosa en la sangre. Gracias a que un eficiente transportador de glucosa en los hepatocitos **(GLUT2)** equilibra rápidamente las concentraciones de glucosa en el citosol y en la sangre (véase la Fig. 11–30 para la cinética del mismo transportador, GLUT2, en los eritrocitos), la elevada K_m de la hexoquinasa IV permite su regulación directa por el nivel de glucosa sanguínea **(Fig. 15–12)**. Cuando la concentración de glucosa en la sangre es alta, tal como sucede después de una comida rica en glúcidos, la glucosa sanguínea en exceso es transportada a los hepatocitos en donde la hexoquinasa IV la convierte en glucosa 6-fosfato. Dado que la hexoquinasa IV no está saturada a 10 mM de glucosa, su actividad continúa aumentando a medida que la concentración de glucosa sube hasta 10 mM o más. En

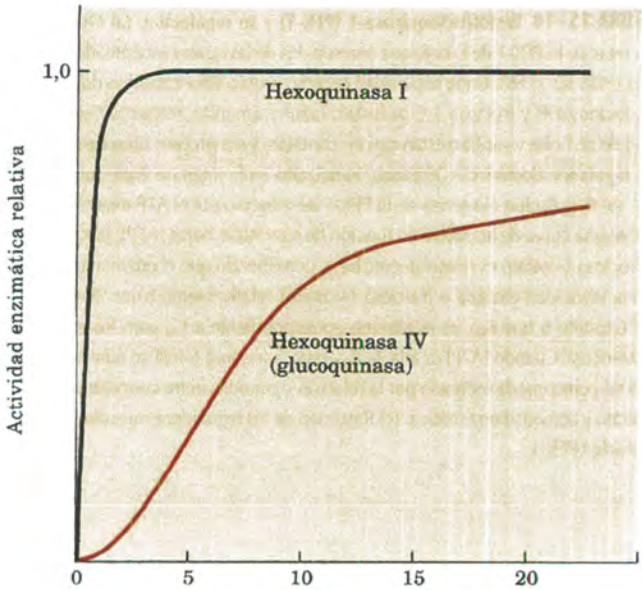


FIGURA 15–12 Comparación de las propiedades cinéticas de la hexoquinasa IV (glucoquinasa) y la hexoquinasa I. Observe la sigmoidicidad de la hexoquinasa IV y la K_m mucho más baja de la hexoquinasa I. Cuando la glucosa sanguínea se eleva por encima de 5 mM, aumenta la actividad de la hexoquinasa IV, pero la hexoquinasa I ya está funcionando cerca de V_{max} a glucosa 5 mM, por lo que no puede responder a un aumento en la concentración de glucosa. Las hexoquinasas I, II y III tienen propiedades cinéticas parecidas.

condiciones de glucosa sanguínea baja, la concentración de glucosa en un hepatocito es baja en relación a la K_m de la hexoquinasa IV, por lo que la glucosa generada por la gluconeogénesis abandona la célula antes de ser atrapada por fosforilación.

Segundo, la hexoquinasa IV no es inhibida por la glucosa 6-fosfato por lo que puede así continuar operando cuando la acumulación de glucosa 6-fosfato inhibe completamente las hexoquinasas I–III. Finalmente, la hexoquinasa IV está sujeta a inhibición por la unión reversible de una proteína reguladora específica del hígado **(Fig. 15–13)**. La unión es mucho más fuerte en presencia del efector alostérico fructosa 6-fosfato. La glucosa compite con la fructosa 6-fosfato por la unión produciendo la disociación de la proteína reguladora de la hexoquinasa IV, con la eliminación consiguiente de la inhibición. Inmediatamente después de una comida rica en glúcidos, cuando la glucosa sanguínea es elevada, la glucosa entra en el hepatocito a través de GLUT2 y activa la hexoquinasa IV mediante este mecanismo. Durante un ayuno, cuando la glucosa sanguínea desciende por debajo de 5 mM, la fructosa 6-fosfato desencadena la inhibición de la hexoquinasa IV por la proteína reguladora, de modo que el hígado no compite con otros órganos por la escasa glucosa. Es interesante el mecanismo de inhibición por la proteína reguladora: la proteína ancla la hexoquinasa IV dentro del núcleo en donde queda segregada de otros enzimas de la glucólisis en el citosol (Fig. 15–13). Cuando aumenta la concentración de glucosa en el citosol, se equilibra con la glucosa del núcleo por transporte a través de poros nucleares. La glucosa produce la disociación de la proteína reguladora y la hexoquinasa IV entra en el citosol y empieza a fosforilar la glucosa.

La hexoquinasa IV (glucoquinasa) y la glucosa 6-fosfatasa están reguladas a nivel de transcripción

La hexoquinasa IV también está regulada a nivel de la síntesis de proteínas. Las circunstancias que exigen una mayor producción de energía (baja [ATP], alta [AMP], contracción muscular vigorosa) o un mayor consumo de glucosa (elevada glucosa sanguínea, por ejemplo) provocan un aumento de la transcripción del gen de la hexoquinasa IV. La glucosa 6-fosfatasa, el enzima gluconeogénico que rodea el paso de la hexoquinasa en la glucólisis, está regulado a nivel de la transcripción por factores que exigen mayor producción de glucosa (baja glucosa sanguínea, señalización por glucagón). La regulación de la transcripción de estos dos enzimas (junto con otros enzimas de la glucólisis y de la gluconeogénesis) se describe a continuación.

La fosfofructoquinasa-1 y la fructosa 1,6-bisfosfatasa se regulan recíprocamente

Tal como se ha dicho anteriormente, la glucosa 6-fosfato puede fluir hacia la glucólisis o hacia cualquiera de otras rutas diferentes entre las que se cuentan la síntesis de glucógeno y la ruta de las pentosas fosfato. La reacción metabólicamente irreversible catalizada por la PFK-1 es la etapa que compromete el paso de la glucosa a través de la glucólisis. Además de sitios de fijación para sus sustratos, este enzima complejo tiene varios sitios reguladores en los que se fijan activadores o inhibidores alostéricos.

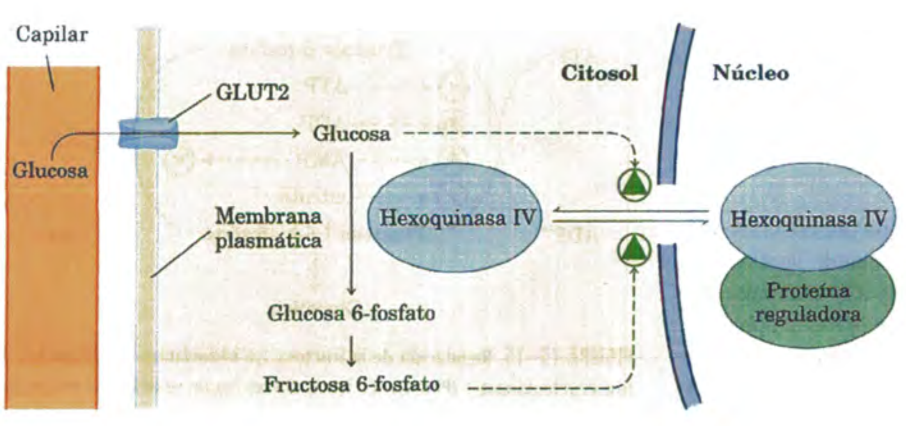
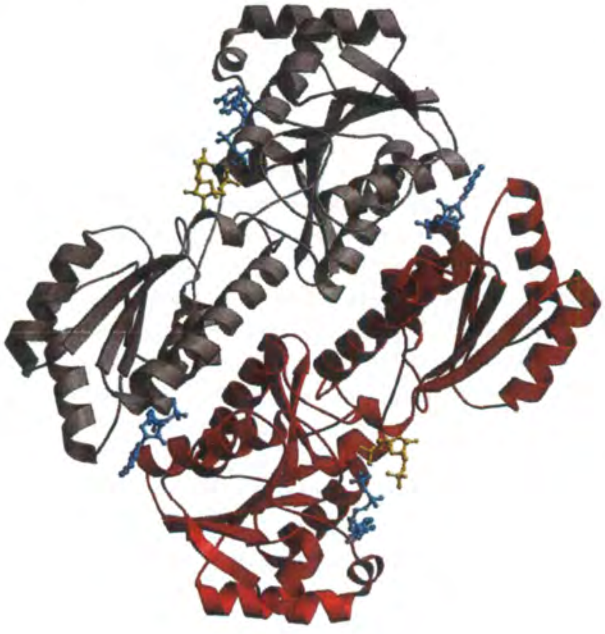
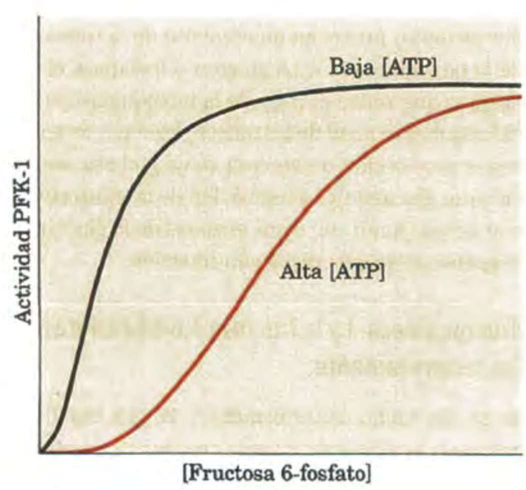


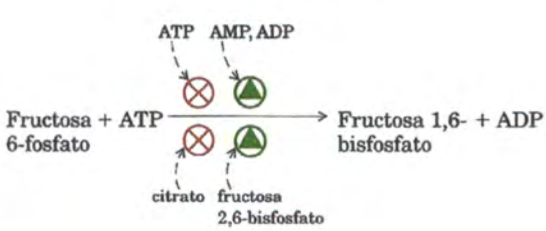
FIGURA 15–13 Regulación de la hexoquinasa IV (glucoquinasa) mediante secuestro en el núcleo. El inhibidor proteico de la hexoquinasa IV es una proteína de unión nuclear que arrastra la hexoquinasa IV al núcleo cuando la concentración de fructosa 6-fosfato en el hígado es elevada y lo libera al citosol cuando la concentración de glucosa es elevada.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 15–14 Fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) y su regulación. (a) Diagrama de cintas de la PFK-1 de *E. coli*, que muestra dos de las cuatro subunidades idénticas (PDB ID 1PFK). Cada subunidad tiene su propio sitio catalítico donde los productos ADP y fructosa 1,6-bisfosfato (azul y amarillo, respectivamente en modelo de bolas y varillas) están casi en contacto, y sus propios sitios de fijación del regulador alostérico ADP (azul), localizado en la interfase entre subunidades. **(b)** Regulación alostérica de la PFK-1 de músculo por el ATP mostrada mediante una curva de actividad en función de sustrato. A bajas [ATP], la $K_{0,5}$ para la fructosa 6-fosfato es relativamente baja, permitiendo que el enzima funcione a una velocidad elevada a [fructosa 6-fosfato] relativamente bajas. (Recuerde del Capítulo 6 que $K_{0,5}$ es el término correspondiente a K_m para los enzimas alostéricos). Cuando [ATP] es alta, la $K_{0,5}$ para la fructosa 6-fosfato aumenta mucho tal como queda indicado por la relación sigmoidea entre concentración de sustrato y actividad enzimática. **(c)** Resumen de los reguladores que afectan a la actividad PFK-1.

El ATP no es sólo sustrato de la PFK-1 sino también uno de los productos finales de la ruta glucolítica. Cuando la elevada [ATP] celular señala que se está produciendo ATP más rápidamente de lo que se consume, el ATP inhibe la PFK-1 al fijarse a un sitio alostérico y disminuir la afinidad del enzima por la fructosa 6-fosfato **(Fig. 15–14)**. El ADP y el AMP, que aumentan su concentración cuando el consumo de ATP es superior a su producción, actúan alostéricamente para aliviar esta inhibición por el ATP. Estos efectos se combinan para producir una actividad enzimática superior cuando se acumulan ADP o AMP y disminuyen la actividad cuando se acumula el ATP.

El citrato (la forma ionizada del ácido cítrico), que es un intermediario clave en la oxidación aeróbica del piruvato, de los ácidos grasos y de los aminoácidos, actúa también como regulador alostérico de la PKF-1; una concentración alta de citrato aumenta el efecto inhibidor del ATP, reduciendo aún más el flujo de glucosa a través de la glucólisis. En este caso, como en muchos otros que encontraremos más adelante, el citrato sirve como señal intracelular de que la célula está alcanzando sus niveles necesarios de metabolismo productor de energía al oxidar grasas y proteínas.

El paso correspondiente de la gluconeogénesis es la conversión de la fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato **(Fig. 15–15)**. El enzima que cataliza esta reacción, la FBPasa-I, es fuertemente inhibido (de forma alostérica) por el AMP; cuando el suministro celular de ATP es bajo (correspondiente a una elevada [AMP], la síntesis de glucosa que requiere ATP se enlentece.

De este modo, pasos opuestos en las rutas glucolítica y gluconeogénica, PFK-1 y PBPasa-1, se regulan de manera coordi-

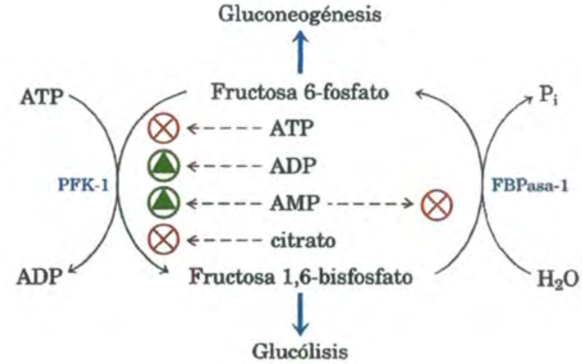


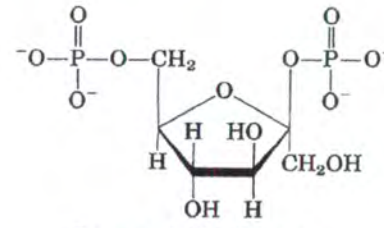
FIGURA 15–15 Regulación de la fructosa 1,6-bisfosfatasa-1 (FBPasa-1) y la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1). En las siguientes figuras se detalla el importante papel de la fructosa 2,6-bisfosfato en la regulación de este ciclo de sustrato.

nada y recíproca. En general, cuando se encuentran presentes concentraciones suficientes de acetil-CoA o citrato (el producto de la condensación del acetil-CoA con el oxalacetato), o cuando una alta proporción del adenilato celular está en forma de ATP, se favorece la gluconeogénesis. Cuando aumenta el nivel de AMP, se promueve la glucólisis por estimulación de la PFK-1 (y, tal como veremos en la Sección 15.5, se promueve la degradación del glucógeno por activación de la glucógeno fosforilasa).

La fructosa 2,6-bisfosfato es un regulador alostérico potente de la PFK-1 y de la FBPasa-1

El papel especial del hígado en el mantenimiento de un nivel constante de glucosa sanguínea requiere mecanismos reguladores adicionales para coordinar la producción y el consumo de glucosa. Cuando descienden los niveles sanguíneos de glucosa la hormona **glucagón** indica al hígado que produzca y libere más glucosa y que deje de consumirla para sus propias necesidades. Una fuente de glucosa es el glucógeno almacenado en el hígado; otra fuente es la gluconeogénesis que utiliza piruvato, lactato, glicerol o ciertos aminoácidos como material inicial. Cuando la concentración de glucosa sanguínea es elevada, la insulina señala al hígado que utilice glucosa como combustible y como precursor para la síntesis y almacenamiento de glucógeno y triacilglicerol.

La rápida regulación hormonal de la glucólisis y de la gluconeogénesis está mediada por la **fructosa 2,6-bisfosfato,** un efector alostérico de los enzimas PFK-1 y FBPasa-1:



Fructosa 2,6-bisfosfato

Cuando se fija la fructosa 2,6-bisfosfato a su sitio alostérico sobre la PFK-1, aumenta la afinidad de este enzima hacia su sustrato fructosa 6-fosfato y reduce su afinidad hacia los inhibidores alostéricos ATP y citrato (**Fig. 15–16**). A las concentraciones fisiológicas de sus sustratos ATP y fructosa 6-fosfato así como de los restantes efectores positivos y negativos (ATP, AMP y citrato), la PFK-1 es virtualmente inactiva en ausencia de fructosa 2,6-bisfosfato. La fructosa 2,6-bisfosfato tiene el efecto opuesto sobre la FBPasa-1; reduce su afinidad por sus sustrato (Fig. 15–16c) disminuyendo así la gluconeogénesis.

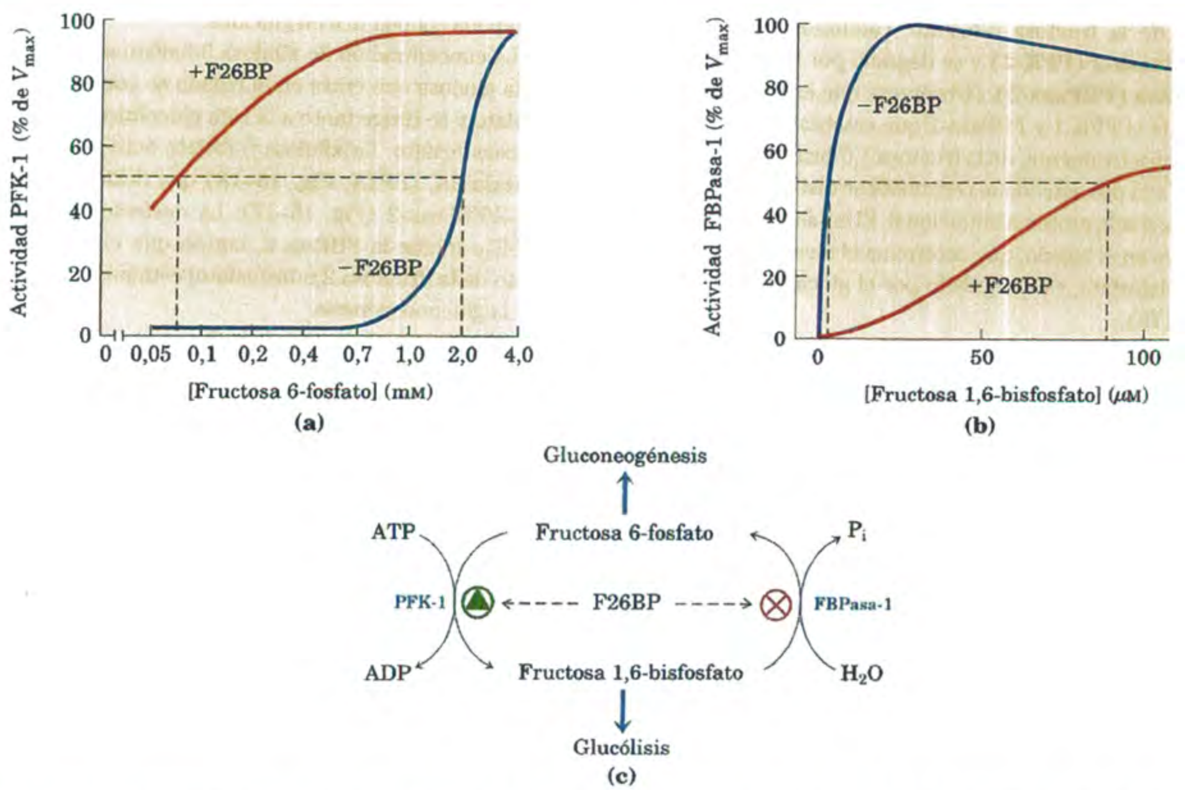


FIGURA 15–16 Papel de la fructosa 2,6-bisfosfato en la regulación de la glucólisis y de la gluconeogénesis. La fructosa 2,6-bisfosfato (F26BP) tiene efectos opuestos sobre las actividades enzimáticas de la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1, un enzima glucolítico) y la fructosa 1,6-bisfosfatasa-1 (FBPasa-1, un enzima gluconeogénico). **(a)** La actividad PFK-1 en ausencia de F26BP (curva azul) es mitad de la máxima cuando la concentración de fructosa 6-fosfato es 2 mM (esto es, $K_{0,5}$ = 2 mM). Cuando está presente 0,13 μM de F26BP (curva roja), la $K_{0,5}$ para la fructosa 6-fosfato es de sólo 0,08 mM. Así, F26BP activa la PFK-1 aumentando su afinidad aparente por la fructosa 6-fosfato (Fig. 15–14b). **(b)** La actividad FBPasa-1 es inhibida por tan solo F26BP 1 μM y es fuertemente inhibida por 25 μM. En ausencia de este inhibidor (curva azul) la $K_{0,5}$ para la fructosa 1,6-bisfosfato es 5 μM, pero en presencia de F26BP 25 μM (curva roja) la $K_{0,5}$ es >70 μM. La fructosa 2,6-bisfosfato también hace que la FBPasa-1 sea más sensible a la inhibición por otro regulador alostérico, el AMP. **(c)** Resumen de la regulación por la F26BP.

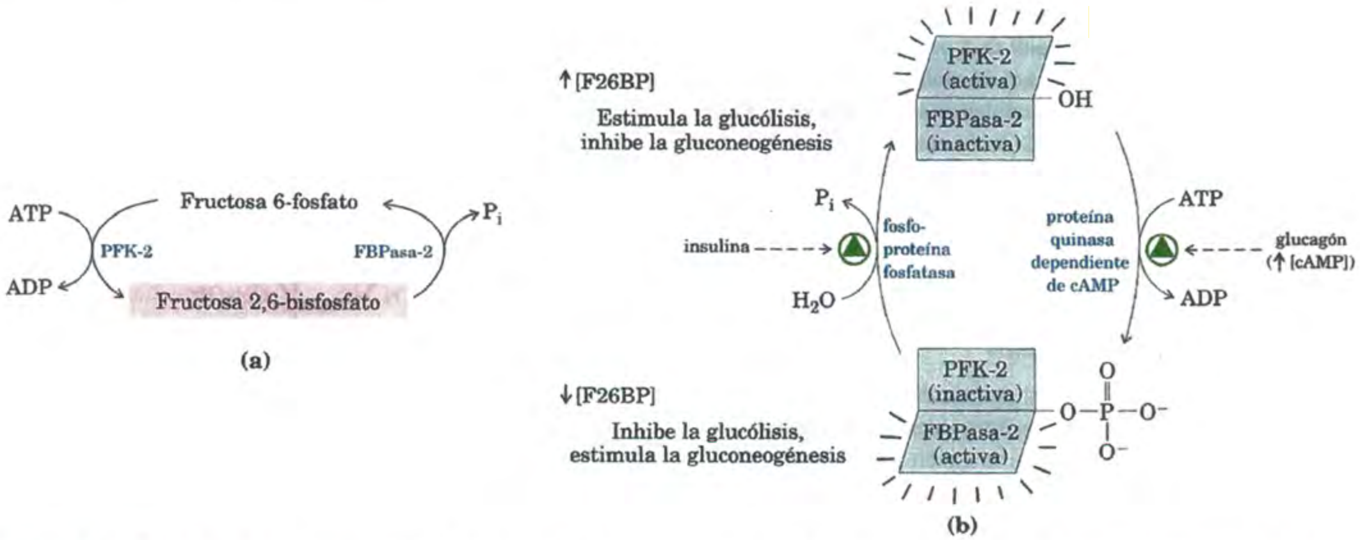


FIGURA 15–17 Regulación de la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato. (a) La concentración celular del regulador fructosa 2,6-bisfosfato (F26BP) viene determinada por las velocidades de su síntesis por la fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) y degradación por la fructosa 2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2). **(b)** Ambas actividades enzimáticas forman parte de la misma cadena polipeptídica y ambas están reguladas, de manera recíproca, por la insulina y el glucagón.

La concentración celular del regulador alostérico fructosa 2,6-bisfosfato viene dictada por las velocidades relativas de formación y degradación (**Fig. 15–17a**). Se forma por fosforilación de la fructosa 6-fosfato, catalizada por la **fosfofructoquinasa-2 (PFK-2)** y se degrada por la **fructosa 2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2)**. (Obsérvese que estos enzimas son distintos de la PFK-1 y FBPasa-1 que catalizan la formación y rotura, respectivamente, de la fructosa 1,6-bisfosfato.) PFK-2 y FBPasa-2 son dos actividades enzimáticas distintas que forman parte de una sola proteína bifuncional. El equilibrio de estas dos actividades en el hígado, que determina el nivel celular de fructosa 2,6-bisfosfato, está regulado por el glucagón y la insulina (Fig. 15–17b).

Tal como vimos en el Capítulo 12 (p. 431), el glucagón estimula la adenilato ciclasa del hígado que sintetiza 3′,5′-AMP cíclico (cAMP) a partir de ATP. A su vez, el AMP cíclico activa una proteína quinasa dependiente de cAMP, que transfiere un grupo fosforilo desde el ATP al enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2. La fosforilación de esta proteína logra potenciar su actividad FBPasa-2 e inhibir su actividad PFK-2. De este modo el glucagón disminuye el nivel celular de fructosa 2,6-bisfosfato, inhibiendo la glucólisis y estimulando la gluconeogénesis. La producción resultante de más glucosa permite que el hígado reponga los niveles de glucosa sanguínea en respuesta al glucagón. La insulina tiene el efecto opuesto, activando una fosfoproteína fosfatasa que cataliza la eliminación del grupo fosforilo de la proteína bifuncional PFK-2/FBPasa-2, aumentando su actividad PFK-2, incrementando la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, estimulando la glucólisis e inhibiendo la gluconeogénesis.

La xilulosa 5-fosfato es un regulador clave de los metabolismos glucídico y lipídico

Otro mecanismo regulador también actúa controlando la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato. En el hígado de mamíferos, la xiluosa 5-fosfato (p. 560), un producto de la ruta de las pentosas fosfato (ruta de las hexosas monofosfato), favorece el incremento de la glucólisis que tiene lugar después de la ingestión de una comida rica en glúcidos.

La concentración de xilulosa 5-fosfato aumenta a medida que la glucosa que entra en el hígado se convierte en glucosa 6-fosfato y se dirige tanto a la ruta glucolítica como a la de las pentosas fosfato. La xilulosa 5-fosfato activa la fosfoproteína fosfatasa 2A, (PP2A; **Fig. 15–18**) que desfosforila el enzima PFK-2/FBPasa-2 (Fig. 15–17). La desfosforilación activa la PFK-2 e inhibe la FBPasa-2, con lo que el consiguiente aumento de la [fructosa 2,6-bisfosfato] estimula la glucólisis e inhibe la gluconeogénesis.

El aumento de la glucólisis dispara la producción de acetil-CoA, mientras que el incremento en el flujo de hexosa a través de la ruta de las pentosas fosfato genera NADPH. El acetil-CoA y el NADPH son los materiales de partida para la síntesis de ácidos grasos, de la que ya se sabe hace mucho tiempo que aumenta de forma espectacular después de una comida rica en glúcidos. La xilulosa 5-fosfato también aumenta la síntesis de *todos* los enzimas requeridos para la síntesis de ácidos grasos de acuerdo con la predicción del análisis de control metabólico. Volveremos a comentar este efecto durante nuestra discusión de la integración de los metabolismos glucídico y lipídico en el Capítulo 23.

El enzima glucolítico piruvato quinasa es inhibido alostéricamente por el ATP

En los vertebrados hay al menos tres isozimas de la piruvato quinasa que difieren en su distribución tisular y en su respuesta a los moduladores. Concentraciones elevadas de ATP, acetil-CoA y ácidos grasos de cadena larga (indicadores de un suministro abundante de energía) inhiben alostéricamente todos los isozimas de la piruvato quinasa (**Fig. 15–19**). El isozima hepático (forma L), pero no el isozima muscular (forma M), está su-

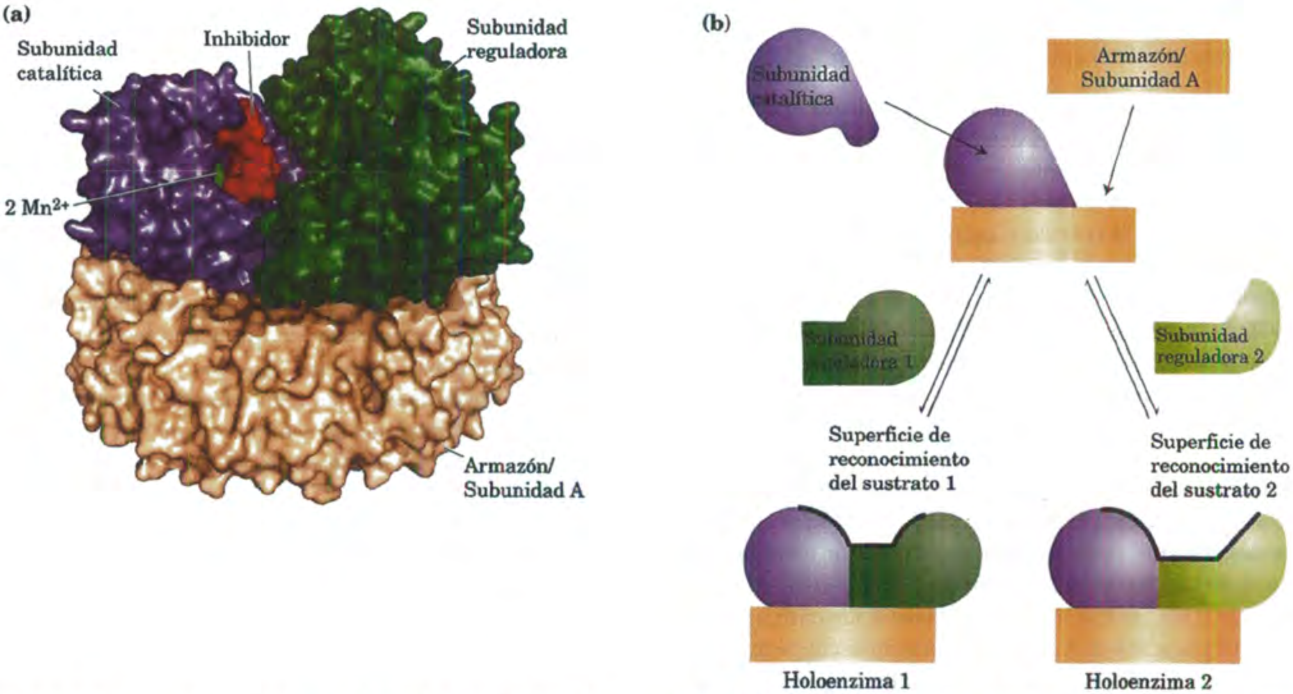


FIGURA 15–18 Estructura y acción de la fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A). **(a)** La subunidad catalítica tiene dos iones Mn^{2+} en su sitio activo, en posición cercana a la superficie de reconocimiento del sustrato formada por la interfase entre la subunidad catalítica y la subunidad reguladora (PDB ID 2NPP). La microcistina-LR, mostrada aquí en rojo, es un inhibidor específico de la PP2A. Las subunidades catalíticas y reguladoras descansan en un armazón (la subunidad A) que las sitúa en relación de una con la otra y da forma al sitio de reconocimiento de sustrato. **(b)** La PP2A reconoce varias proteínas diana y su especificidad viene dada por la subunidad reguladora. Cada una de las subunidades reguladoras se encaja en el armazón que contiene la subunidad catalítica y cada subunidad reguladora crea su sitio de unión de sustrato único.

jeto a una regulación adicional por fosforilación. Cuando una baja concentración de glucosa en sangre provoca la liberación de glucagón, la proteína quinasa dependiente de cAMP fosforila el isozima L de la piruvato quinasa, inactivándolo. De este modo disminuye la utilización de glucosa como combustible por el hígado, reservándola para su exportación al cerebro y a otros órganos. En el músculo, el efecto del aumento de la [cAMP] es totalmente diferente. En respuesta a la adrenalina, el cAMP activa la degradación del glucógeno y la glucólisis, y proporciona el combustible necesario para la respuesta de luchar o huir.

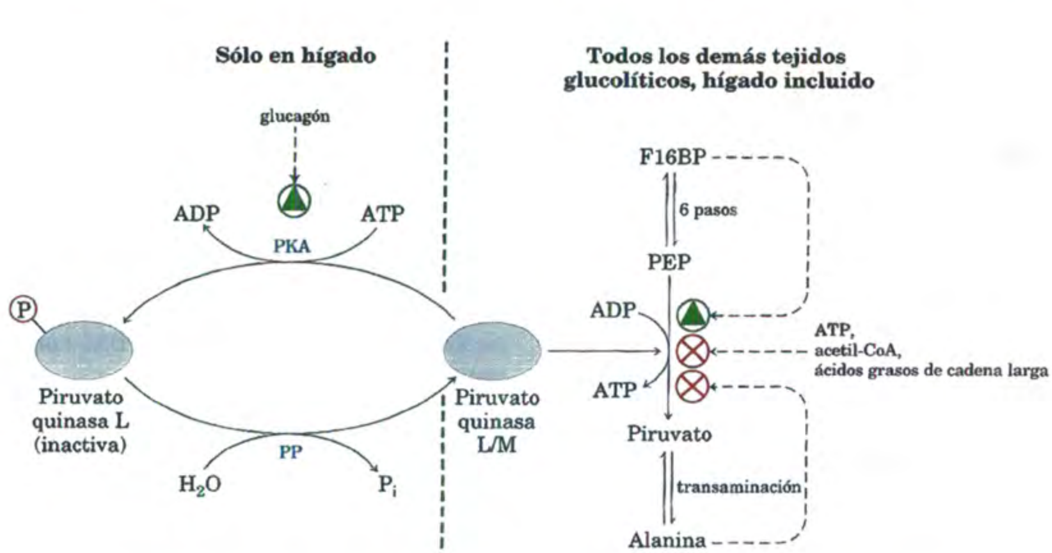


FIGURA 15–19 Regulación de la piruvato quinasa. El enzima está inhibido alostéricamente por el ATP, acetil-CoA y ácidos grasos de cadena larga (todos ellos signo de abundante suministro energético), mientras que la acumulación de fructosa 1,6-bisfosfato provoca su activación. La acumulación de alanina, que se puede sintetizar a partir del piruvato en un paso, inhibe alostéricamente la piruvato quinasa, haciendo más lenta la producción de piruvato por la glucólisis. El isozima hepático (forma L) también está regulado hormonalmente; el glucagón activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA; véase la Fig. 15–35), la cual fosforila el isozima L de la piruvato quinasa inactivándolo. Cuando desciende la concentración de glucagón, una proteína fosfatasa (PP) desfosforila la piruvato quinasa activándola. Este mecanismo impide que el hígado consuma glucosa a través de la glucólisis cuando la concentración de glucosa en sangre es baja; en lugar de ello el hígado exporta glucosa. Este mecanismo de fosforilación no afecta el isozima muscular (forma M).

La conversión gluconeogénica del piruvato en fosfoenol piruvato se encuentra bajo múltiples tipos de regulación

En la ruta que conduce del piruvato a la glucosa, el primer punto de control determina el destino del piruvato en la mitocondria. El piruvato se puede convertir en acetil-CoA, mediante el complejo de la piruvato deshidrogenasa para impulsar el ciclo de ácido cítrico (Capítulo 16), o bien en oxalacetato (por la piruvato carboxilasa) para iniciar el proceso de la gluconeogénesis **(Fig. 15–20)**. Cuando los ácidos grasos son fácilmente asequibles como combustible, su degradación en las mitocondrias hepáticas produce acetil-CoA, señal de que no es necesaria la oxidación de glucosa como combustible. El acetil-CoA es un modulador alostérico positivo de la piruvato carboxilasa y un modulador negativo de la piruvato deshidrogenasa, a través de la estimulación de una proteína quinasa que inactiva la deshidrogenasa. Cuando están satisfechas las demandas energéticas de la célula, la fosforilación oxidativa se hace más lenta y aumenta la concentración de NADH en relación a la de NAD^+, lo que inhibe el ciclo del ácido cítrico y a su vez se acumula acetil-CoA. El incremento en la concentración de acetil-CoA inhibe el complejo de la piruvato deshidrogenasa, con lo que la formación de acetil-CoA a partir del piruvato se hace más lenta estimulándose la gluconeogénesis por

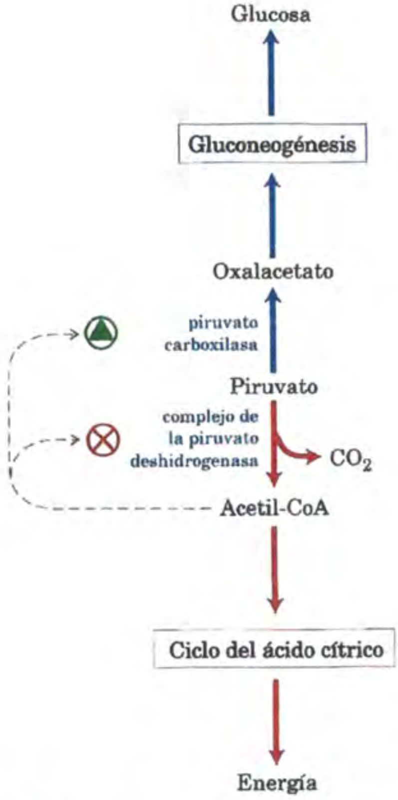


FIGURA 15–20 Dos destinos alternativos para el piruvato. El piruvato se puede convertir en glucosa y glucógeno vía gluconeogénesis o ser oxidado a acetil-CoA para la producción de energía. El primer enzima de cada ruta está regulado alostéricamente; el acetil-CoA, producido por oxidación de los ácidos grasos o por el complejo de la piruvato deshidrogenasa, estimula la piruvato carboxilasa e inhibe la piruvato deshidrogenasa.

activación de la piruvato carboxilasa. Este hecho permite que el exceso de piruvato se convierta en oxalacetato (y, en último término, en glucosa).

El oxalacetato formado de esta manera se convierte en fosfoenolpiruvato (PEP) en la reacción catalizada por la PEP carboxiquinasa (Fig. 15–11). En los mamíferos, la regulación de este enzima clave tiene lugar principalmente a nivel de su síntesis y degradación, en respuesta a señales de la dieta y hormonales. El ayuno o niveles elevados de glucagón actúan a través del cAMP para incrementar la velocidad de transcripción y estabilizar el mRNA. La insulina, o una concentración elevada de glucosa sanguínea, tienen los efectos opuestos. A continuación se analiza con mayor detalle esta regulación de la transcripción. Estos cambios, provocados generalmente por una señal exterior a la célula (dieta, hormonas), tienen lugar en una escala de tiempo de minutos a horas.

La regulación de la glucólisis y de la gluconeogénesis por cambios en la transcripción hace variar el número de moléculas de enzima

La mayor parte de las acciones reguladoras dicutidas hasta el momento están mediadas por mecanismos rápidos fácilmente reversibles: efectos alostéricos, alteración covalente (fosforilación) del enzima o unión a una proteína reguladora. En otro conjunto de procesos reguladores intervienen cambios en el número de moléculas de un enzima en la célula, a través de cambios en el balance de la síntesis y degradación del enzima. Nuestra discusión se orienta ahora a la regulación de la transcripción a través de factores de transcripción activados por señales.

En el Capítulo 12 encontramos receptores nucleares y factores de transcripción en el contexto de la señalización por la insulina. La insulina actúa a través de su receptor en la membrana plasmática para activar al menos dos rutas de señalización diferentes; en cada una de ellas se produce la activación de una proteína quinasa. La MAP quinasa ERK, por ejemplo, fosforila los factores de transcripción SRF y Elk1 (véase la Fig. 12–15) que a continuación estimulan la síntesis de enzimas necesarios para el crecimiento y la división celulares. La proteína quinasa B (PKB; también denominada Akt) fosforila otro conjunto de factores de transcripción (PDX1, por ejemplo) que estimulan la síntesis de enzimas que metabolizan glúcidos y grasas formados y almacenados después de un exceso de ingestión de glúcidos con la dieta. En las células β pancreáticas, PDX1 también estimula la síntesis de la misma insulina.

La insulina regula la transcripción de más de 150 genes; los humanos tienen al menos siete tipos generales de elementos de respuesta a la insulina, cada uno de los cuales es reconocido por un subconjunto de factores de transcripción activados por la insulina en diferentes condiciones. La insulina estimula la transcripción de los genes que codifican las hexoquinasas II y IV, la PFK-1, la piruvato quinasa y la PFK-2/FBPasa-2 (todas ellas implicadas en la glucólisis y su regulación), y diversos enzimas de la síntesis de ácidos grasos, así como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzimas todos ellos de la ruta de las pentosas fosfato que generan el NADPH necesario para la síntesis de los ácidos grasos. Además, la insulina también enlentece la expresión de los genes de dos enzi-

TABLA 15–5 Algunos genes regulados por la insulina

Cambio en la expresión génica	Ruta
Expresión aumentada	
Hexoquinasa II	Glucólisis
Hexoquinasa IV	Glucólisis
Fosfofructoquinasa-1 (PFK-1)	Glucólisis
Piruvato quinasa	Glucólisis
PFK-2/FB Pasa-2	Regulación de glucólisis/gluconeogénesis
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	Ruta de las pentosas fosfato (NADPH)
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	Ruta de las pentosas fosfato (NADPH)
Piruvato deshidrogenasa	Síntesis de ácidos grasos
Acetil-CoA carboxilasa	Síntesis de ácidos grasos
Enzima málico	Síntesis de ácidos grasos (NADPH)
ATP-citrato liasa	Síntesis de ácidos grasos (suministra acetil-CoA)
Complejo de la ácido graso sintasa	Síntesis de ácidos grasos
Estearil-CoA deshidrogenasa	Desaturación de ácidos grasos
Acil-CoA-glicerol transferasas	Síntesis de triacilgliceroles
Expresión disminuida	
PEP carboxiquinasa	Gluconeogénesis
Glucosa 6-fosfatasa (subunidad catalítica)	Liberación de glucosa a la sangre

mas de la gluconeogénesis: PEP carboxiquinasa y glucosa 6-fosfatasa (Tabla 15–5).

Un factor de transcripción importante para el metabolismo glucídico es el **ChREBP (proteína de unión a los elementos de respuesta glucídica; Fig. 15–21)**, que se expresa principalmente en el hígado, tejido adiposo y riñón. Sirve para coordinar la síntesis de enzimas necesarios para la síntesis de glúcidos y de grasas. El ChREBP en su forma inactiva está fosforilado y se localiza en el citosol. Cuando la fosfoproteína fosfatasa PP2A (Fig. 15–18) elimina un grupo fosforilo de ChREBP, el factor de transcripción puede entrar en el núcleo. Aquí la PP2A elimina otro grupo fosforilo y ahora el ChREBP se une a su proteína asociada, Mlx, activando la síntesis de diversos enzimas: piruvato quinasa, ácido graso sintasa y acetil-CoA carboxilasa, primer enzima de la vía de la síntesis de ácidos grasos (Fig. 15–21).

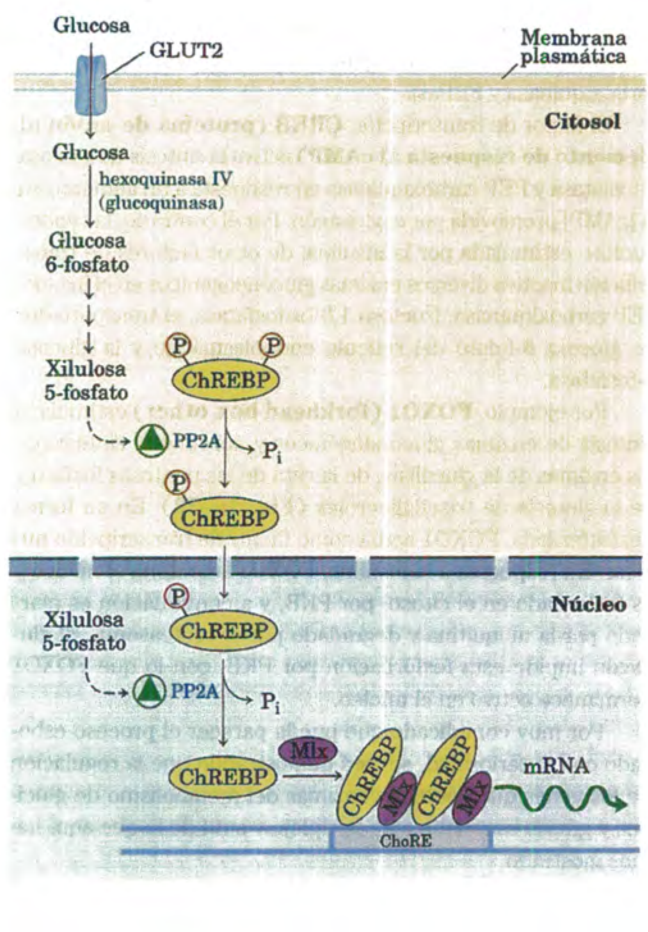


FIGURA 15–21 Mecanismo de regulación génica del factor de transcripción ChREBP. Cuando el ChREBP en el citosol de un hepatocito se fosforila en un residuo Ser y otro Thr, no puede entrar en el núcleo. La desfosforilación de Ⓟ-Ser por la proteína fosfatasa PP2A permite que ChREBP entre en el núcleo, en donde una segunda desfosforilación, de Ⓟ-Thr, activa ChREBP de manera que se puede asociar con su proteína afín, Mlx. ChREBP–Mlx se une ahora al elemento de respuesta de glúcidos (ChoRE) en el promotor y estimula la transcripción. PP2A es activado alostéricamente por xilulosa 5-fosfato, un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato.

El control de la actividad PP2A, y de este modo, en último término, la síntesis de este grupo de enzimas metabólicos, corre a cargo de la xilulosa 5-fosfato, un intermediario no de la glucólisis o de la gluconeogénesis, sino de la ruta de las pentosas fosfato. Cuando la concentración de glucosa sanguínea es elevada, la glucosa entra en el hígado y es fosforilada por la hexoquinasa IV. La glucosa 6-fosfato así formada puede entrar en la ruta glucolítica o en la ruta de las pentosas fosfato. Si lo hace en esta segunda dos oxidaciones iniciales producen xilulosa 5-fosfato, que actúa de señal de que las rutas de utilización de la glucosa están bien abastecidas de sustrato. Esto lo consigue activando alostéricamente la PP2A que, a continuación, desfosforila ChREBP, permitiendo que el factor de transcripción active la expresión de los genes que codifican los enzimas de la glucólisis y de la síntesis de ácidos grasos (Fig. 15–21).

La glucólisis produce piruvato y la conversión del piruvato en acetil-CoA proporciona el material de partida para la síntesis de ácidos grasos: la acetil-CoA carboxilasa convierte el acetil-CoA en malonil-CoA, este último primer intermediario comprometido en la ruta de los ácidos grasos. El complejo de la ácido graso sintasa produce ácidos grasos que se exportan al tejido adiposo y se almacenan allí en forma de triacilgliceroles (Capítulo 21). De esta forma, el exceso de glúcido ingerido en la dieta se almacena en forma de grasa.

Otro factor de transcripción hepático, **SREBP-1c**, un miembro de la familia de **proteínas de unión a los elementos de respuesta a esteroles** (véase la Fig. 21–43) activa la síntesis de piruvato quinasa, hexoquinasa IV, lipoproteína lipasa, acetil-CoA carboxilasa y el complejo de la ácido graso sintasa que convierten el acetil-CoA (producido a partir del piruvato) en ácidos grasos para el almacenamiento en los adipocitos. La síntesis de SREBP-1c es estimulada por la insulina y reprimida por el glucagón. SREBP-1c también suprime la expresión de diversos enzimas gluconeogénicos: glucosa 6-fosfatasa, PEP carboxiquinasa y FBPasa-1.

El factor de transcripción **CREB (proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP)** activa la síntesis de glucosa 6-fosfatasa y PEP carboxiquinasa en respuesta a un aumento en la [cAMP] promovida por el glucagón. Por el contrario, la *inactivación*, estimulada por la insulina, de otros factores de transcripción inactiva diversos enzimas gluconeogénicos en el hígado: PEP carboxiquinasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, el transportador de glucosa 6-fofato del retículo endoplasmático y la glucosa 6-fosfatasa.

Por ejemplo, **FOXO1 (forkhead box other)** estimula la síntesis de enzimas gluconeogénicos y suprime la síntesis de los enzimas de la glucólisis, de la ruta de las pentosas fosfato y de la síntesis de triacilgliceroles **(Fig. 15–22)**. En su forma desfosforilada, FOXO1 actúa como factor de transcripción nuclear. En respuesta a la insulina, FOXO1 abandona el núcleo y es fosforilado en el citosol por PKB, y a continuación es marcado por la ubiquitina y degradado por el proteasoma. El glucagón impide esta fosforilación por PKB, con lo que FOXO1 permanece activo en el núcleo.

Por muy complicado que pueda parecer el proceso esbozado con anterioridad, se está demostrando que la regulación de los genes que codifican enzimas del metabolismo de glúcidos y grasas es mucho más complejo y sutil de lo que aquí hemos mostrado.

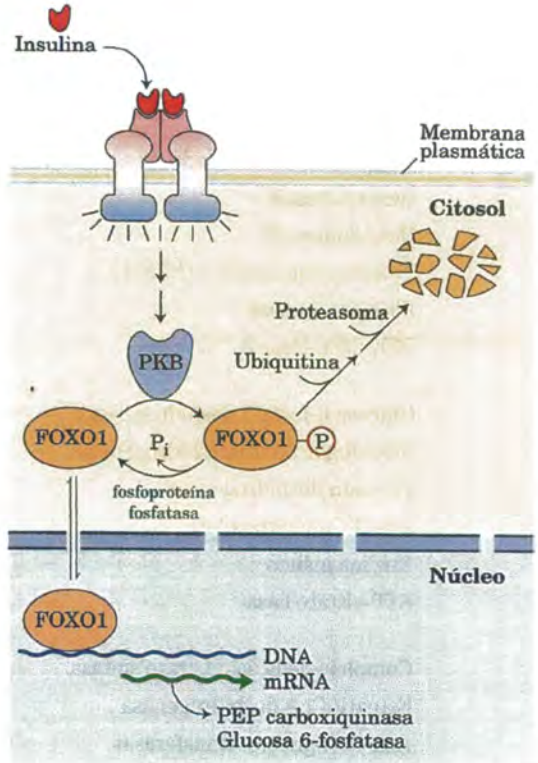
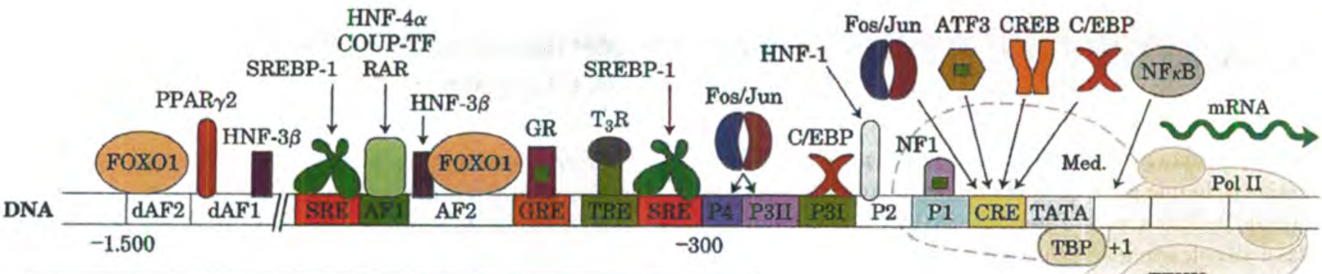


FIGURA 15–22 Mecanismo de regulación génica por parte del factor de transcripción FOXO1. La insulina activa la cascada de señalización mostrada en la Figura 12–16, que conduce a la activación de la proteína quinasa B (PKB). FOXO1 es fosforilado en el citosol por PKB y el factor de transcripción fosforilado es marcado por la unión de ubiquitina para la degradación por proteasomas. El FOXO1 que permanece sin fosforilar o que es desfosforilado puede entrar en el núcleo, donde se une a un elemento de respuesta y desencadena la transcripción de los genes asociados. La insulina tiene, por tanto, el efecto de *inactivar* la expresión de estos genes, que incluyen la PEP carboxiquinasa y la glucosa 6–fosfatasa.

Numerosos factores de transcripción pueden actuar sobre el mismo promotor génico; múltiples proteína quinasas y fosfatasas pueden activar o inactivar estos factores de transcripción, y diversos factores proteicos accesorios modulan la acción de los factores de transcripción. Esta complejidad es manifiesta, por ejemplo, en el gen que codifica la PEP carboxiquinasa, un caso muy bien estudiado de control de la transcripción. Su región promotora **(Fig. 15–23)** tiene 15 o más elementos de respuesta reconocidos por, al menos, una docena de factores de transcripción conocidos y otros que probablemente se descubrirán en un futuro próximo. Los factores de transcripción actúan de manera combinada en esta región promotora, y en centenares de otros promotores génicos, para afinar con precisión los niveles de centenares de enzimas metabólicos, coordinando su actividad en el metabolismo de glúcidos y grasas. La importancia crítica de los factores de transcripción en la regulación metabólica es muy aparente al observar los efectos de mutaciones en sus genes. Así ejemplo, al menos cinco tipos diferentes de diabetes de aparición en la madurez de los jóvenes (MODY) se encuentran asociados con mutaciones en factores de transcripción específicos (Recuadro 15–3).



Factores de transcripción

FOXO1	forkhead box other 1
PPARγ2	receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ2
HNF-3β	factor nuclear hepático 3β
SREBP-1	proteína de unión al elemento regulador de esteroles 1
HNF-4α	factor nuclear hepático 4α
COUP-TF	factor de transcripción del promotor corriente arriba de la ovalbúmina de gallina
RAR	receptor del ácido retinoico
GR	receptor de glucocorticoides
T_3R	receptor de la hormona tiroidea
C/EBP	proteína de unión potenciadora de CAAT
HNF-1	factor nuclear hepático 1
NF1	factor nuclear 1
ATF3	factor activador de la transcripción 3
CREB	proteína de unión al elemento de regulación de cAMP
NFκB	factor nuclear κB
TBP	proteína de unión a la secuencia TATA
Med.	mediador
TFIIH	factor de transcripción IIH

Elementos de respuesta y sitios de unión reguladores en el promotor

dAF2	factor accesorio distal 2
dAF1	factor accesorio distal 1
SRE	elemento regulador de esteroles
AF1	factor accesorio 1
AF2	factor accesorio 2
GRE	elemento regulador de glucocorticoides
TRE	elemento regulador de la hormona tiroidea
CRE	elemento regulador de cAMP

FIGURA 15–23 La región promotora de la PEP carboxiquinasa, en donde se muestra la complejidad de las señales reguladoras de este gen. Este diagrama muestra los factores de transcripción (los iconos más pequeños unidos al DNA) que se sabe que regulan la transcripción del gen de la PEP carboxiquinasa. La magnitud con la que se expresa el gen depende de la señal combinada que afecta a todos estos factores que puede reflejar la disponibilidad de nutrientes, la concentración de glucosa en sangre y otros factores que intervienen en la síntesis, por la célula, de este enzima en un momento determinado. P1, P2, P3I, P3II y P4 son sitios de unión de proteína identificados por el método de la huella con la DNasa I (véase el Recuadro 26–1). La secuencia TATA es el punto de unión para el complejo de transcripción de la RNA polimerasa II (Pol II).

RECUADRO 15–3 MEDICINA Mutaciones genéticas causantes de formas raras de diabetes

El término "diabetes" describe diversas situaciones médicas que tienen en común la producción en exceso de orina. En el Recuadro 11–2 describimos la diabetes insípida, en la que la reabsorción defectuosa de agua en el riñón es el resultado de una mutación en el gen de la acuoporina. La "diabetes mellitus" se refiere específicamente a la enfermedad en la que está alterada la capacidad de metabolizar glucosa debido a un fallo del páncreas para producir insulina o la resistencia de los tejidos a las acciones de la insulina.

Existen dos tipos principales de diabetes mellitus. El tipo I, también llamada diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), es debida al ataque autoinmune sobre las células β del páncreas productoras de insulina. Los individuos con IDDM han de administrarse insulina por vía inyectable o por inhalación para compensar su carencia de células β. La IDDM se desarrolla durante la infancia o en la adolescencia; por este motivo un nombre antiguo de la enfermedad era diabetes juvenil. El tipo 2, también llamado diabetes mellitus independiente de insulina (NIDDM), se desarrolla de forma típica en adultos de más de 40 años de edad. Es mucho más frecuente que la IDDM y su aparición entre la población está fuertemente correlacionada con la obesidad. La epidemia actual de obesidad en los países más desarrollados lleva consigo la promesa de una epidemia de NIDDM, lo que constituye un fuerte incentivo para conocer la relación entre obesidad y aparición de NIDDM tanto a nivel genético como bioquímico. Después de completar nuestra visión del metabolismo de grasas y proteínas en capítulos posteriores, volveremos (en el Capítulo 23) a la discusión de la diabetes que tienen un efecto amplio sobre el metabolismo: de los glúcidos, grasas y proteínas.

Aquí consideramos otro tipo de diabetes en la que está alterado el metabolismo de glúcidos y grasas: la diabetes de aparición madura en los jóvenes (MODY), en la que mutaciones genéticas afectan un factor de transcripción importante en el transporte de la señal de la insulina al núcleo o afectan al enzima que responde a la insulina. En MODY2, una mutación del gen de la hexoquinasa IV (glucoquinasa), afecta al hígado y páncreas, tejidos en los que ésta es la principal isoforma de la hexoquinasa. La glucoquinasa de las células β pancreáticas actúa como sensor de la glucosa. Normalmente, cuando se eleva la glucosa sanguínea, también aumenta la glucosa en las células β y, dado que la glucoquinasa tiene una K_m relativamente elevada para la glucosa, su actividad aumenta con el aumento de la concentración sanguínea de glucosa. El metabolismo de la glucosa

(continúa en la página siguiente)

RECUADRO 15–3 MEDICINA **Mutaciones genéticas causantes de formas raras de diabetes** *(continuación de la página anterior)*

6-fosfato formada en esta reacción aumenta el nivel de ATP en las células β, lo que provoca la liberación de insulina según el mecanismo mostrado en la Figura 23–28. En los individuos sanos, las concentraciones de glucosa sanguínea de ~5 mM desencadenan la liberación de insulina. Pero los individuos con mutaciones desactivadoras en ambas copias del gen de la glucoquinasa tienen umbrales muy elevados para la liberación de insulina y, en consecuencia, desde el nacimiento presentan hiperglucemia grave, es decir diabetes neonatal permanente. En los individuos que tienen una copia mutada y otra normal del gen de la glucoquinasa, el umbral de glucosa para la liberación de insulina aumenta a aproximadamente 7 mM. En consecuencia, estos individuos tienen unos niveles de glucosa en sangre ligeramente superiores a lo normal: normalmente tienen una hiperglucemia suave sin síntomas. Esta condición (MODY2) se descubre generalmente por accidente durante análisis rutinarios de glucosa en sangre.

Hay al menos otros cinco tipos de MODY, siendo cada uno de ellos el resultado de una mutación inactivadora en uno u otro de los factores de transcripción esenciales para el desarrollo normal y función de las células β pancreáticas. Los individuos con estas mutaciones tienen grados diversos de producción disminuida de insulina con los defectos asociados para la homeostasis de la glucosa sanguínea.

En MODY1 y MODY3, los defectos son suficientemente graves, por lo que se producen las complicaciones a largo plazo asociadas con IDDM y NIDDM: problemas cardiovasculares, fallo renal y ceguera. En cambio, MODY4, 5 y 6 son formas menos graves de la enfermedad.

En conjunto, las enfermedades MODY representan un pequeño porcentaje de los casos de NIDDM. También son muy raros los individuos con mutaciones en el gen de la propia insulina; presentan defectos en la señalización por la insulina de gravedad diversa.

RESUMEN 15.3 Regulación coordinada de la glucólisis y la gluconeogénesis

- La glucólisis y la gluconeogénesis comparten siete enzimas que catalizan las reacciones reversibles de las rutas. En los tres pasos restantes, las reacciones directa e inversa están catalizadas por enzimas diferentes, siendo éstos los puntos de regulación de las dos rutas.
- La hexoquinasa IV (glucoquinasa) tiene propiedades cinéticas relacionadas con su papel especial en el hígado: libera glucosa a la sangre cuando la glucosa sanguínea es baja y capta y metaboliza la glucosa cuando la glucosa sanguínea es elevada.
- La PFK-1 se inhibe alostéricamente por el ATP y el citrato. En la mayoría de tejidos de mamífero, hígado incluido, la PFK-1 se activa alostéricamente por la fructosa 2,6-bisfosfato.
- La piruvato quinasa se inhibe alostéricamente por el ATP y el isozima hepático es también inhibido por fosforilación dependiente de cAMP.
- La gluconeogénesis está regulada a nivel de la piruvato carboxilasa (que es activada por el acetil-CoA) y de la FBPasa-1 (que es inhibida por la fructosa 2,6-bisfosfato y por el AMP).
- Para limitar el ciclado inútil entre la glucólisis y la gluconeogénesis, las dos rutas están bajo control alostérico recíproco que se consigue mayoritariamente por los efectos opuestos de la fructosa 2,6-bisfosfato sobre la PFK-1 y la FBPasa-1.
- El glucagón o la adrenalina disminuyen la [fructosa 2,6-bisfosfato] al aumentar la [cAMP] y fosforilar el enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2. La insulina aumenta la [fructosa 2,6-bisfosfato] al activar una fosfoproteína fosfatasa que desfosforila y, de este modo, activa la PFK-2.
- La xilulosa 5-fosfato, un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato, activa la fosfoproteína fosfatasa PP2A, que desfosforila varias proteínas diana, entre ellas PFK-2/FBPasa-2, inclinando el equilibrio hacia la captación de glucosa, síntesis de glucógeno y síntesis de lípidos en el hígado.
- Factores de transcripción, entre los que se cuentan ChREBP, CREB, SREBP y FOXO1, actúan en el núcleo regulando la expresión de genes específicos que codifican enzimas de las rutas glucolítica y gluconeogénica. La insulina y el glucagón actúan de manera antagonista en la activación de estos factores de transcripción, con lo que activan e inhiben gran número de genes.

15.4 Metabolismo del glucógeno en animales

Nuestra discusión sobre la regulación metabólica, utilizando el metabolismo glucídico como ejemplo principal, se gira ahora a la síntesis y degradación del glucógeno. En esta sección nos fijamos en las rutas metabólicas; en la Sección 15.5 abordaremos los mecanismos e regulación.

En organismos que van de bacterias a plantas y a vertebrados, el exceso de glucosa se convierte en formas poliméricas para su almacenamiento: glucógeno en los vertebrados y muchos microorganismos, y almidón en las plantas. En los vertebrados el glucógeno se encuentra principalmente en el hígado y en el músculo esquelético; puede representar hasta el 10% del peso del hígado y el 1 al 2% del peso del músculo. Si toda esta cantidad de glucosa se disolviese en el citosol de un hepatocito, su concentración sería de aproximadamente 0,4 M, una cantidad

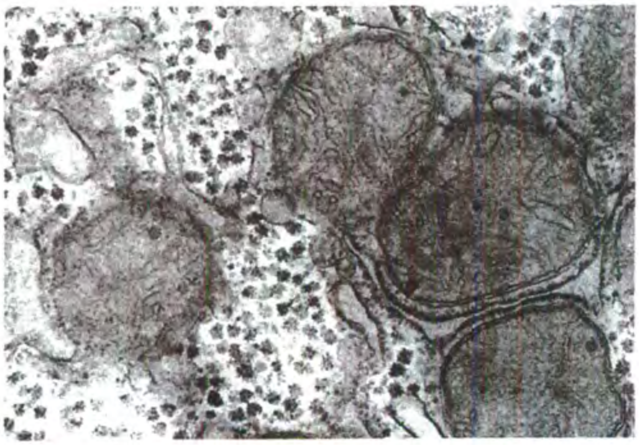


FIGURA 15–24 Gránulos de glucógeno en un hepatocito. El glucógeno es una forma de almacenamiento de glúcidos que aparece como partículas de alta densidad electrónica, a menudo formando agregados o rosetas. En los hepatocitos el glucógeno está íntimamente asociado con túbulos del retículo endoplasmático liso. También se ven muchas mitocondrias en esta micrografía.

suficiente para dominar las propiedades osmóticas de la célula. Sin embargo, cuando se almacena en forma de polímero largo (glucógeno) la misma masa de glucosa tiene una concentración de tan sólo 0,01 μM. El glucógeno se almacena en forma de grandes gránulos citosólicos. La partícula elemental de glucógeno, la partícula β, de unos 21 nm de diámetro consiste en unos 55.000 residuos de glucosa con unos 2.000 extremos no reductores. Entre 20 y 40 de estas partículas se agrupan formando rosetas α, que son fácilmente visibles al microscopio en muestras de tejido de animales bien alimentados **(Fig. 15–24)** si bien están prácticamente ausentes en los animales sometidos a un ayuno de 24 horas.

El glucógeno del músculo se encuentra allí para proporcionar una fuente de energía rápida para el metabolismo tanto aeróbico como anaeróbico. El glucógeno muscular se puede agotar en menos de una hora durante la actividad vigorosa. El glucógeno hepático sirve como almacén de glucosa para otros tejidos cuando no está disponible glucosa en la dieta (entre comidas o durante el ayuno); esto es de especial interés para las neuronas del cerebro que no pueden utilizar ácidos grasos como combustible. El glucógeno hepático puede desaparecer en un período de 12 a 24 horas. En los humanos, la cantidad total de energía almacenada en forma de glucógeno es mucho menor que la cantidad almacenada en forma de grasa (triacilglicerol) (véase la Tabla 23–5), pero las grasas no se pueden convertir en glucosa en los mamíferos y no se pueden catabolizar anaeróbicamente.

Los gránulos de glucógeno son agregados complejos de glucógeno y de los enzimas que lo sintetizan y degradan así como la maquinaria utilizada para regular esos enzimas. Los mecanismos generales de almacenamiento y movilización del glucógeno son los mismos en el músculo que en el hígado si bien los enzimas difieren en aspectos sutiles, aunque importantes, que reflejan los diferentes papeles del glucógeno en los dos tejidos. El glucógeno también se obtiene de la dieta y se degrada en el intestino, lo que implica un conjunto diferente de enzimas hidrolíticos que convierten el glucógeno en glucosa libre. (El almidón de la dieta se hidroliza de forma similar.) Empezaremos nuestra discusión con la degradación el glucógeno a glucosa 1-fosfato **(glucogenólisis)** para a continuación examinar la síntesis de glucógeno **(glucogénesis).**

La degradación del glucógeno está catalizada por la glucógeno fosforilasa

En el músculo esquelético y en el hígado las unidades de glucosa de las ramas exteriores del glucógeno entran en la ruta glucolítica a través de la acción de tres enzimas: glucógeno fosforilasa, enzima desramificador del glucógeno y fosfoglucomutasa. La glucógeno fosforilasa cataliza la reacción en la que un enlace glucosídico ($\alpha 1 \rightarrow 4$) que une dos residuos de glucosa en un extremo no reductor del glucógeno sufre un ataque por parte de fosfato inorgánico (P_i), eliminando el residuo glucosa terminal en forma de **α-D-glucosa 1-fosfato (Fig. 15–25)**. Esta reacción de *fosforólisis* es diferente de la *hidrólisis* de

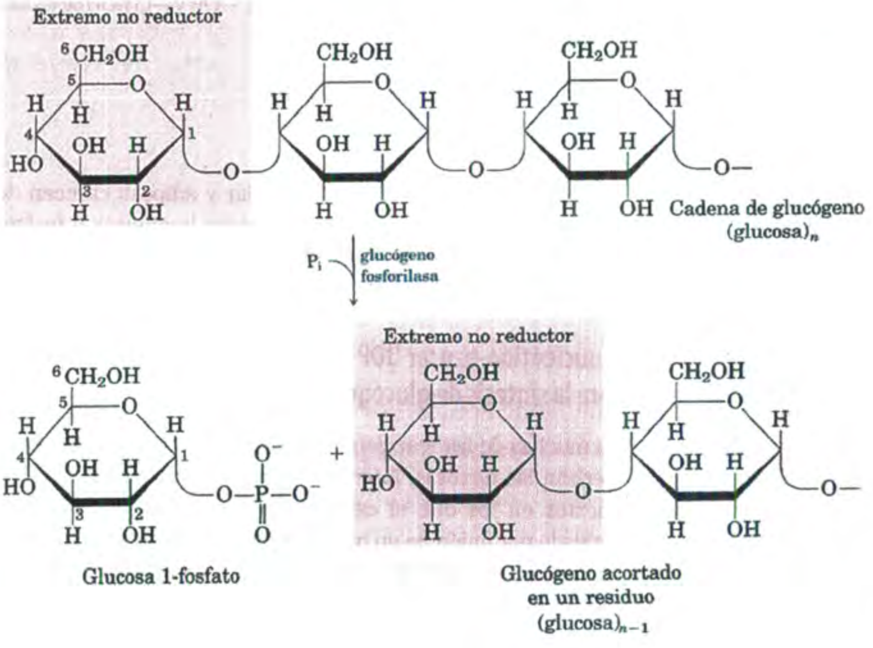


FIGURA 15–25 Eliminación de un residuo de glucosa del extremo no reductor de una cadena de glucógeno por la glucógeno fosforilasa. Este proceso es repetitivo; el enzima elimina residuos de glucosa sucesivos hasta que alcanza la cuarta unidad de glucosa desde un punto de ramificación (véase la Fig. 15–26).

enlaces glucosídicos por la amilasa durante la degradación intestinal del glucógeno o del almidón de la dieta. En la fosforólisis, se conserva parte de la energía del enlace glucosídico en la formación del éster fosfato, glucosa 1-fosfato (véase la Sección 14.2).

El piridoxal fosfato es un cofactor esencial en la reacción de la glucógeno fosforilasa; su grupo fosfato actúa como catalizador ácido general, promoviendo el ataque del P_i sobre el enlace glucosídico. (Éste es un papel inusual de este cofactor. En la Fig. 18–6 se describirá con detalle un papel más típico como cofactor en el metabolismo de los aminoácidos.)

La glucógeno fosforilasa actúa repetitivamente sobre los extremos no reductores de las ramas del glucógeno hasta que alcanza un punto que se halla a cuatro residuos de glucosa de un punto de ramificación ($\alpha1\rightarrow6$) (véase la Fig. 7–14) en donde se detiene su acción. La degradación posterior por la glucógeno fosforilasa sólo tiene lugar después de la acción de un **enzima desramificante,** formalmente conocido como **oligo ($\alpha1\rightarrow6$) a ($\alpha1\rightarrow4$) glucanotransferasa,** que cataliza dos reacciones sucesivas que transfieren ramificaciones **(Fig. 15–26)**. Una vez transferidas las ramificaciones y se ha hidrolizado el residuo glucosilo en C-6, la glucógeno fosforilasa continúa su actividad.

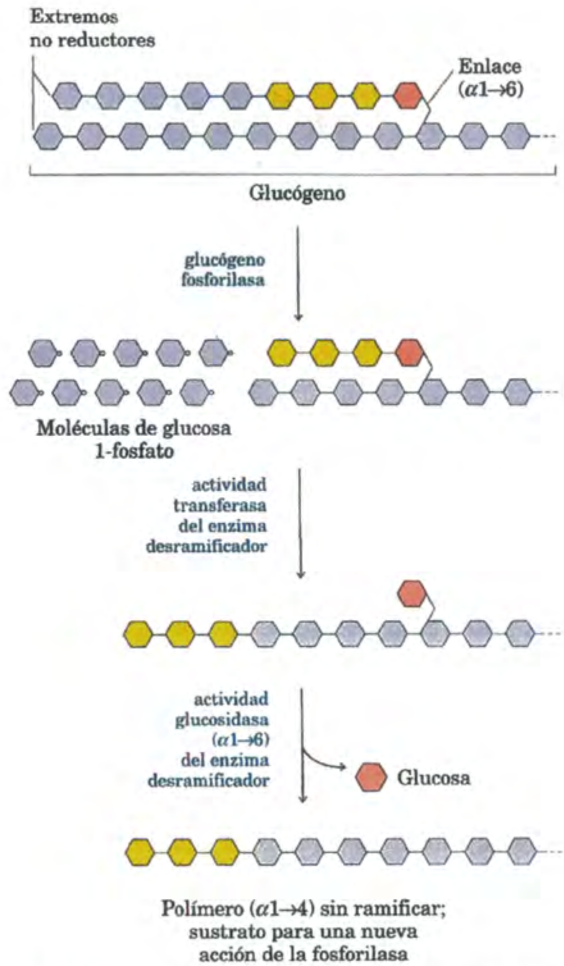


FIGURA 15–26 Degradación del glucógeno cerca de un punto de ramificación ($\alpha1\rightarrow6$). Después de la eliminación secuencial de residuos terminales de glucosa por la glucógeno fosforilasa (véase la Fig. 15–25), los residuos de glucosa cercanos a un punto de ramificación son eliminados mediante un proceso en dos etapas que requiere un enzima desramificador bifuncional. En primer lugar la actividad transferasa del enzima desplaza un bloque de tres residuos de glucosa desde la ramificación a un extremo no reductor cercano al que se unen por enlace ($\alpha1\rightarrow4$). El único residuo de glucosa restante en el punto de ramificación, en enlace ($\alpha1\rightarrow6$), se libera a continuación como glucosa libre por la actividad glucosidasa ($\alpha1\rightarrow6$) del enzima. Los residuos de glucosa se muestran de forma abreviada omitiéndose los grupos —H, —OH y —CH_2OH de los anillos de piranosa.

La glucosa 1-fosfato puede entrar en la glucólisis o, en el hígado, reponer la glucosa sanguínea

La glucosa 1-fosfato, producto final de la reacción de la glucógeno fosforilasa, se convierte en glucosa 6-fosfato por la **fosfoglucomutasa,** que cataliza la reacción reversible

$$\text{Glucosa 1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato}$$

Inicialmente fosforilada en un residuo Ser, el enzima dona un grupo fosforilo al C-6 del sustrato y a continuación acepta un grupo fosforilo del C-1 **(Fig. 15–27)**.

La glucosa 6-fosfato formada a partir del glucógeno en el músculo esquelético puede entrar en la glucólisis y servir como fuente de energía para sostener la contracción muscular. En el hígado, la degradación del glucógeno sirve para un propósito diferente: liberar glucosa a la sangre cuando disminuye el nivel de glucosa sanguínea, tal como sucede entre comidas. Esto requiere un enzima, la glucosa 6-fosfatasa, que está presente en el hígado y riñón, pero no en otros tejidos. El enzima es una proteína integral de membrana del retículo endoplasmático, de la que se predice que contiene nueve hélices transmembrana, con su sitio activo en el lado de la luz del RE. La glucosa 6-fosfato formada en el citosol se transporta a la luz del RE mediante un transportador específico (T1) **(Fig. 15–28)** y se hidroliza en la superficie luminal por la glucosa 6-fosfatasa. Se cree que el P_i y la glucosa resultantes vuelven al citosol mediante dos transportadores diferentes (T2 y T3) y que la glucosa abandona el hepatocito mediante el transportador de la membrana plasmática, GLUT2. Observe que al estar el sitio activo de la glucosa 6-fosfatasa dentro de la luz del RE, la célula separa esta reacción del proceso de la glucólisis, que tiene lugar en el citosol y sería abortado por la acción de la glucosa 6-fosfatasa. Defectos genéticos tanto en la glucosa 6-fosfatasa como en T1 producen trastornos importantes del metabolismo del glucógeno, dando lugar a la enfermedad del almacenamiento del glucógeno tipo Ia (Recuadro 15–1).

Debido a que los tejidos muscular y adiposo carecen de glucosa 6-fosfatasa, no pueden convertir la glucosa 6-fosfato formada por degradación del glucógeno en glucosa, por lo que estos tejidos no aportan glucosa a la sangre.

El nucleótido-azúcar UDP-glucosa aporta glucosa para la síntesis de glucógeno

En muchas de las reacciones en las que se transforman o polimerizan las hexosas, intervienen **nucleótidos–azúcar,** compuestos en los que el carbono anomérico de un azúcar es activado por unión de un nucleótido a través de un enlace éster fosfato. Los nucleótidos–azúcar son los sustratos para la poli-

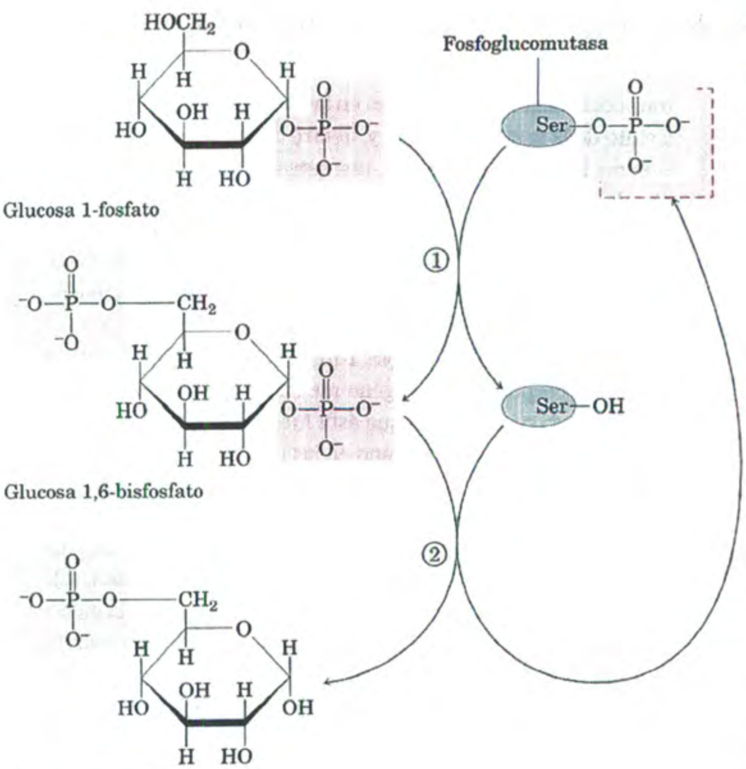


FIGURA 15–27 Reacción catalizada por la fosfoglucomutasa. La reacción empieza con el enzima fosforilado en un residuo Ser. En el paso ① el enzima cede su grupo fosforilo (verde) a la glucosa 1-fosfato, produciendo glucosa 1,6-bisfosfato. En el paso ②, el grupo fosforilo en C-1 de la glucosa 1,6-bisfosfato (rojo) se vuelve a transferir al enzima, volviendo a formar el fosfoenzima y produciendo glucosa 6-fosfato.

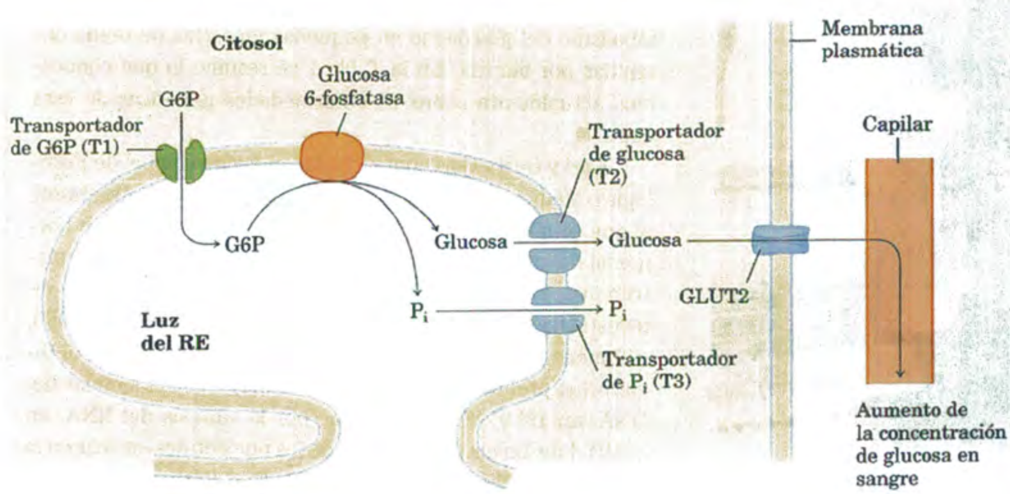
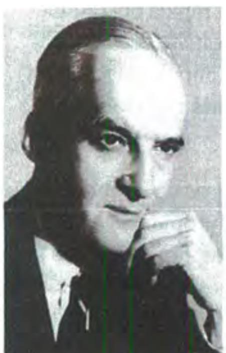
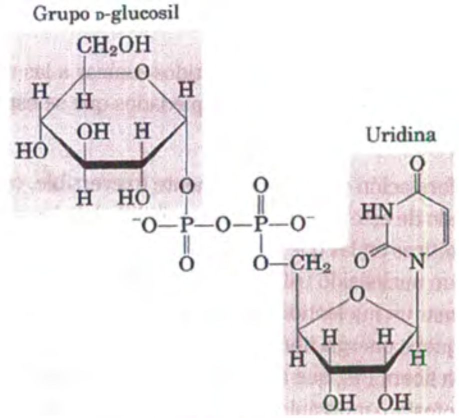


FIGURA 15–28 Hidrólisis de la glucosa 6-fosfato por la glucosa 6-fosfatasa del RE. El sitio catalítico de la glucosa 6-fosfatasa está encarado hacia la luz del RE. Un transportador (T1) de glucosa 6-fosfato (G6P) transporta el sustrato desde el citosol a la luz y los productos glucosa y P_i pasan al citosol mediante transportadores específicos (T2 y T3). La glucosa abandona la célula a través del transportador GLUT2 de la membrana plasmática.



Luis Leloir, 1906–1987

merización de los monosacáridos a disacáridos, glucógeno, almidón, celulosa y polisacáridos extracelulares más complejos. Son también intermediarios clave en la producción de aminohexosas y desoxihexosas encontradas en algunos de estos polisacáridos, y en la síntesis de vitamina C (ácido L-ascórbico). El papel de los nucleótidos–azúcar en la biosíntesis de glucógeno y de muchos derivados glucídicos fue descubierto por Luis Leloir, bioquímico argentino.



UDP-glucosa
(un nucleótido-azúcar)

RECUADRO 15–4 Carl y Gerty Cori: pioneros del metabolismo y enfermedades del glucógeno

Gran parte de lo que está escrito en los actuales libros de texto de bioquímica sobre el metabolismo del glucógeno se descubrió entre 1925 y 1950 por el notable equipo matrimonial de Carl F. Cori y Gerty T. Cori. Ambos se formaron en medicina en Europa al final de la Primera Guerra Mundial (ella completó los estudios premédicos y la Facultad de Medicina en ¡un año¡). Dejaron Europa en 1922 para establecer laboratorios de investigación los Estados Unidos, primero durante nueve años en Buffalo, Nueva York, en lo que es ahora el Roswell Park Memorial Institute, y después a partir de 1931 hasta el final de sus vidas en la Washington University de St. Louis.

En sus estudios fisiológicos iniciales sobre el origen y destino del glucógeno en el músculo de animales, los Cori demostraron la conversión del glucógeno en lactato en tejidos, el paso del lactato de la sangre al hígado y, dentro del hígado, la reconversión del lactato en glucógeno, una ruta que se conoce como ciclo de Cori (véase la Fig. 23–20). Continuando con estas investigaciones a nivel molecular, los Cori demostraron que el glucógeno se movilizaba mediante una reacción de fosforólisis catalizada por el enzima que ellos habían descubierto, la glucógeno fosforilasa. Identificaron el producto de esta reacción (el "éster de Cori") como glucosa 1-fosfato y demostraron que se podía reincorporar al glucógeno mediante la reacción inversa. Aunque esto no demostró que ésta fuese la reacción mediante la que se sintetiza el glucógeno en las células, sí fue la primera demostración in vitro de la síntesis de una macromolécula a partir de subunidades monoméricas sencillas, hecho que inspiró a otros investigadores en la búsqueda de enzimas polimerizadores. Arthur Kornberg, descubridor de la DNA polimerasa, dijo de esta experiencia en el laboratorio de los Cori, que "la glucógeno fosforilasa, no el apareamiento de bases, fue lo que me condujo a la DNA polimerasa".

Los Cori en el laboratorio de Gerty Cori en el año 1947.

Gerty Cori se interesó más adelante por las enfermedades genéticas humanas en las que se almacena demasiado glucógeno en el hígado. Identificó el defecto bioquímico de varias de estas enfermedades y demostró que se pueden diagnosticar mediante ensayos de los enzimas del metabolismo del glucógeno en pequeñas muestras de tejido obtenidas por biopsia. En la Tabla 1 se resume lo que conocemos actualmente sobre 13 enfermedades genéticas de esta clase. ■

Carl y Gerty Cori compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1947 con Bernardo Houssay, de Argentina, al que se mencionó por sus estudios sobre la regulación hormonal del metabolismo de los glúcidos. El laboratorio del matrimonio Cori se convirtió en un centro internacional de investigación bioquímica durante las décadas de 1940 y 1950, y al menos seis científicos que se formaron con los Cori obtuvieron el premio Nobel: Arthur Kornberg (por la síntesis del DNA, en 1959), Severo Ochoa (por la síntesis del RNA, en 1959), Luis Leloir (por el papel de los nucleótidos–azúcar en la síntesis de polisacáridos, en 1970), Earl Sutherland (por el

---

La adecuación de los nucleótidos–azúcar a las reacciones biosintéticas se debe a varias propiedades que se especifican a continuación:

1. Su formación es metabólicamente irreversible, contribuyendo de este modo a la irreversibilidad de las rutas biosintéticas en las que son intermediarios. La condensación de un nucleósido trifosfato con una hexosa 1-fosfato para formar un nucleótido–azúcar tiene una variación en una pequeña energía libre positiva en la célula, pero la reacción libera PP_i, que es rápidamente hidrolizado por la pirofosfato inorgánico hidrolasa **(Fig. 15–29)** en una reacción que es muy exergónica ($\Delta G'^\circ = -19{,}2$ kJ/mol). Esto mantiene baja la concentración celular de PP_i, lo que asegura que la variación real de energía libre en la célula sea favorable. En efecto, la eliminación rápida del producto, impulsada por la gran variación negativa de energía libre que resulta de la hidrólisis del PP_i, impulsa la reacción sintética, una estrategia común a muchas reacciones de polimerización biológicas.

2. Aunque en las transformaciones químicas de los nucleótidos–azúcar no intervienen átomos del propio nucleótido, la parte nucleotídica ofrece muchos grupos potenciales para el establecimiento de interacciones no covalentes con los enzimas; la energía libre de fijación adicional contribuye de manera significativa a la actividad catalítica del enzima (Capítulo 6; véase también la p. 297).

descubrimiento del cAMP en la regulación del metabolismo glucídico, en 1971), Christian de Duve (por el fraccionamiento subcelular, en 1974) y Edwin Krebs (por el descubrimiento de la fosforilasa quinasa, en 1991).

TABLA 1 Enfermedades del almacenamiento del glucógeno en el ser humano

Tipo (nombre)	Enzima afectado	Órgano primario afectado	Síntomas
Tipo 0	Glucógeno sintasa	Hígado	Baja glucosa sanguínea, cuerpos cetónicos elevados, muerte temprana
Tipo Ia (de von Gierke)	Glucosa 6-fosfatasa	Hígado	Hepatomegalia, fallo renal
Tipo Ib	Glucosa 6-fosfato translocasa microsómica	Hígado	Como en Ia; también susceptibilidad elevada a infecciones bacterianas
Tipo Ic	Transportador microsómico de P_i	Hígado	Como en Ia
Tipo II (de Pompe)	Glucosidasa lisosómica	Músculos esquelético y cardíaco	Forma infantil: muerte a la edad de 2 años; forma juvenil: defectos musculares (miopatía); forma adulta: como en la distrofia muscular
Tipo IIIa (de Cori o de Forbes)	Enzima desramificante	Hígado, músculos esquelético y cardíaco	Hepatomegalia en los recién nacidos; miopatía
Tipo IIIb	Enzima desramificante hepático (enzima muscular normal)	Hígado	Hepatomegalia en recién nacidos
Tipo IV (de Andersen)	Enzima ramificante	Hígado, músculo esquelético	Hepato y esplenomegalia, mioglobina en la orina
Tipo V (de McArdle)	Fosforilasa muscular	Músculo esquelético	Rampas inducidas por el ejercicio y dolor; mioglobina en orina
Tipo VI (de Hers)	Fosforilasa hepática	Hígado	Hepatomegalia
Tipo VII (de Tarui)	PFK-1 muscular	Músculo, eritrocitos	Como en tipo V; también anemia hemolítica
Tipo VIb, VIII o IX	Fosforilasa quinasa	Hígado, leucocitos, músculo	Hepatomegalia
Tipo XI (de Fanconi-Bickel)	Transportador de glucosa (GLUT2)	Hígado	Desarrollo impedido, hepatomegalia, raquitismo, disfunción renal

3. Como el fosfato, el grupo nucleotidilo (UMP o AMP) es un excelente grupo saliente, que facilita el ataque nucleofílico al activar el carbono del glúcido al que está unido.
4. Con el "marcado" de algunas hexosas con grupos nucleotidilo, las células pueden dejarlos aparte para un objetivo (síntesis de glucógeno), en un fondo diferente del de las hexosas fosfato marcadas para otro objetivo (glucólisis).

La síntesis de glucógeno tiene lugar virtualmente en todos los tejidos animales pero es especialmente importante en el hígado y en el músculo esquelético. El punto de inicio de la síntesis de glucógeno es la glucosa 6-fosfato. Tal como vimos puede provenir de la glucosa libre en una reacción catalizada por los isozimas hexoquinasa I y hexoquinasa II en el músculo y por la hexoquinasa IV (glucoquinasa) en el hígado:

$$\text{D-Glucosa} + \text{ATP} \longrightarrow \text{D-glucosa 6-fosfato} + \text{ADP}$$

Sin embargo, una parte de la glucosa ingerida va a parar al glucógeno por una vía menos directa. Es captada primeramente por los eritrocitos convirtiéndose glucolíticamente en lactato; éste es a continuación captado por el hígado y convertido en glucosa 6-fosfato mediante gluconeogénesis.

Para iniciar la síntesis de glucógeno, la glucosa 6-fosfato se convierte en glucosa 1-fosfato mediante la reacción de la fosfoglucomutasa:

$$\text{Glucosa 6-fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa 1-fosfato}$$

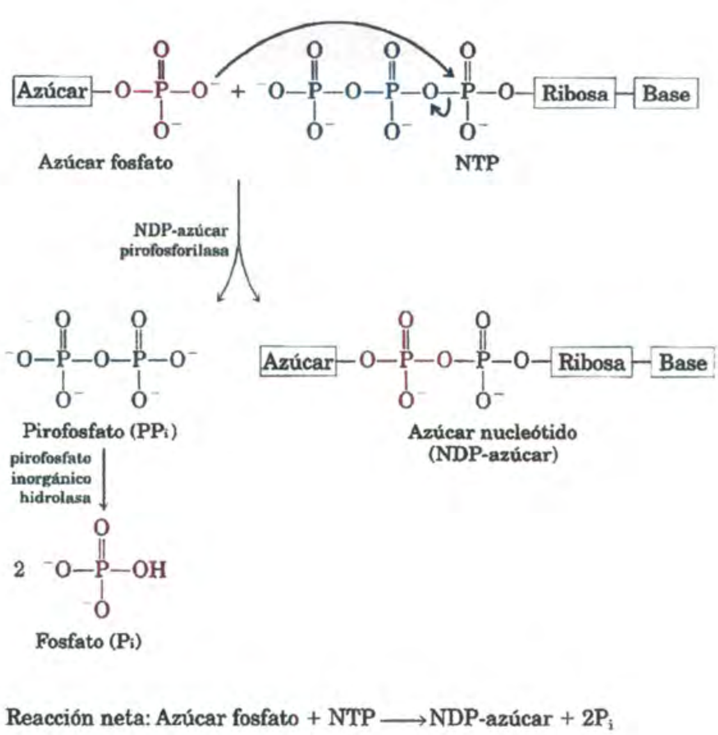


FIGURA 15–29 Formación de un nucleótido azúcar. Se produce una reacción de condensación entre un nucleósido trifosfato (NTP) y un azúcar fosfato. El oxígeno del azúcar cargado negativamente actúa como nucleófilo atacando el fosfato α del nucleósido trifosfato y desplazando pirofosfato. La reacción es impulsada hacia delante gracias a la hidrólisis del PP_i por la pirofosfato inorgánico hidrolasa.

El producto de esta reacción se convierte en UDP-glucosa por acción de la **UDP-glucosa pirofosforilasa** es una reacción clave en la biosíntesis del glucógeno:

$$\text{Glucosa 1-fosfato} + \text{UTP} \longrightarrow \text{UDP-glucosa} + PP_i$$

Observe que este enzima se llama así por la reacción inversa; en la célula, ésta transcurre en la dirección de formación de la UDP-glucosa ya que el pirofosfato se hidroliza a fosfato inorgánico por la pirofosfato inorgánico hidrolasa (Fig. 15–29).

La UDP-glucosa es el dador inmediato de residuos de glucosa en la reacción catalizada por la **glucógeno sintasa,** enzima que promueve la transferencia del residuo de glucosa desde la UDP-glucosa a un extremo no reductor de una molécula ramificada de glucógeno (**Fig. 15–30**). El equilibrio global de la

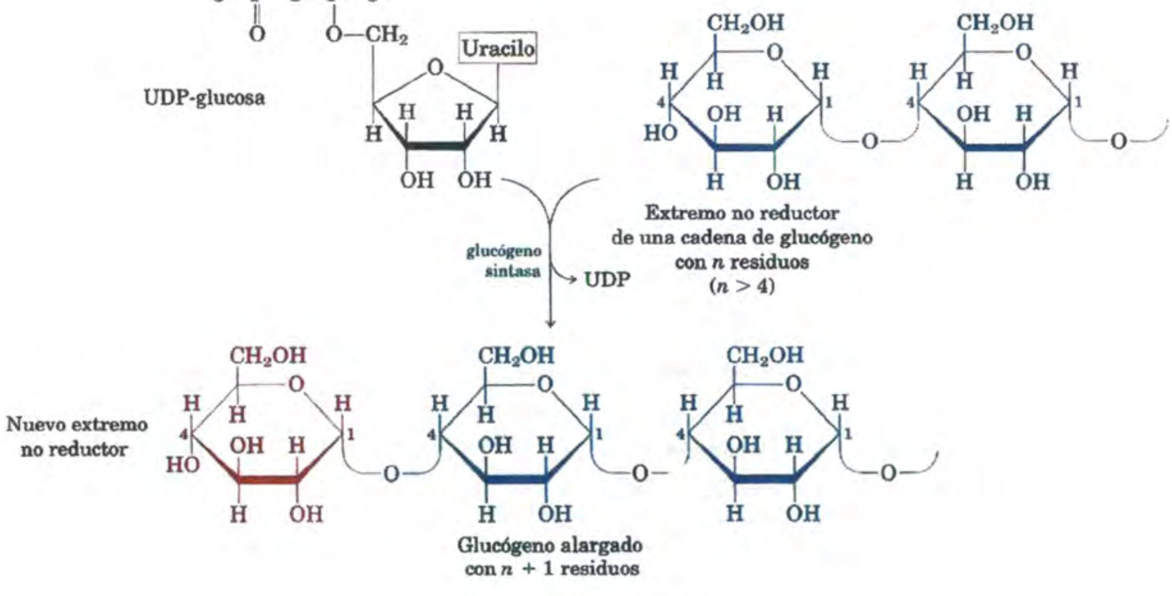


FIGURA 15–30 Síntesis del glucógeno. Una cadena de glucógeno se alarga mediante la glucógeno sintasa. El enzima transfiere el residuo de glucosa de la UDP-glucosa al extremo no reductor de una rama de glucógeno (véase la Fig. 7–14) formando un nuevo enlace ($\alpha1\rightarrow4$).

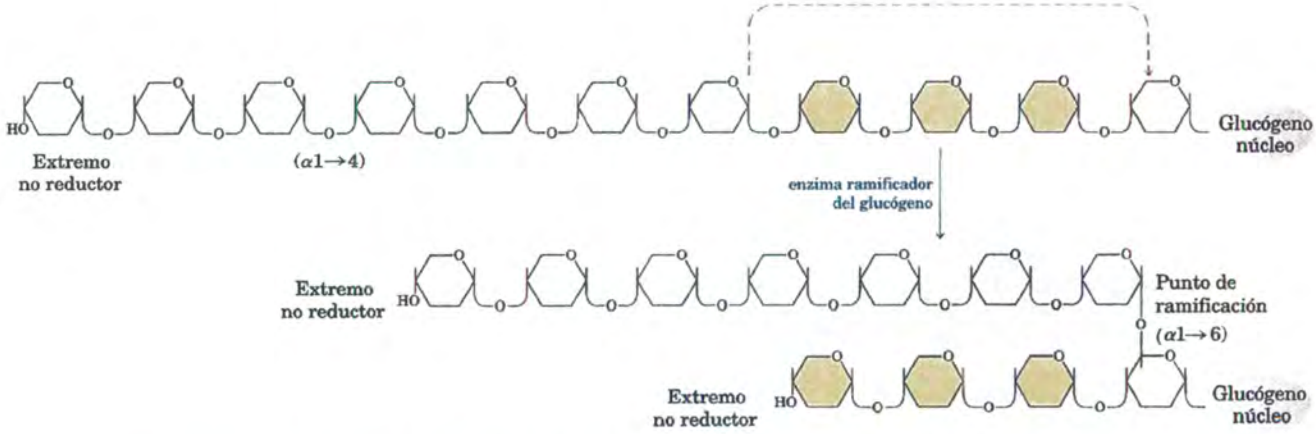


FIGURA 15–31 Síntesis de ramificaciones en el glucógeno. El enzima ramificador del glucógeno (también llamado amilo (1→4) a (1→6) transglucosilasa o glucosil-(4→6)-transferasa) forma un nuevo punto de ramificación durante la síntesis del glucógeno.

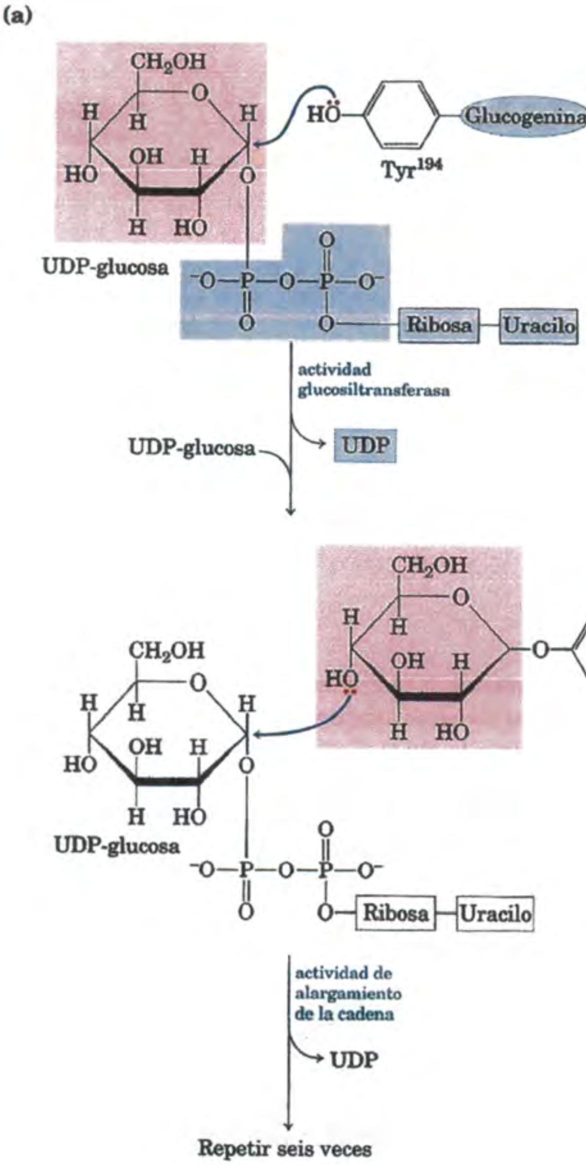
ruta desde glucosa 6-fosfato hasta el glucógeno alargado en una unidad de glucosa favorece enormemente la síntesis del glucógeno.

La glucógeno sintasa no puede formar los enlaces (α1→6) que se encuentran en los puntos de ramificación del glucógeno; la formación de estos enlaces corre a cargo del enzima ramificador del glucógeno, también llamado **amilo (1→4) a (1→6) transglucosilasa** o glucosil-(4→6)-transferasa. El enzima ramificador cataliza la transferencia de un fragmento terminal de 6 o 7 residuos de glucosa desde el extremo no reductor de una rama de glucógeno que tiene al menos 11 residuos al grupo hidroxilo en C-6 de un residuo de glucosa en un punto más interior de la misma o de otra rama de glucógeno, con lo que se crea una nueva rama **(Fig. 15–31)**. La glucógeno sintasa puede añadir más residuos de glucosa a la nueva rama por la glucógeno sintasa. El efecto biológico de la ramificación es que la molécula de glucógeno sea más soluble al tiempo que se aumenta el número de extremos no reductores. Esto aumenta el número de sitios accesibles tanto para la glucógeno fosforilasa como para la glucógeno sintasa, enzimas que sólo actúan en extremos no reductores.

La glucogenina incorpora los residuos iniciales de azúcar del glucógeno

La glucógeno sintasa no puede iniciar de novo una nueva cadena de glucógeno. Requiere un cebador, habitualmente una cadena de (α1→4) poliglucosa que tenga como mínimo ocho residuos de glucosa. ¿Cómo se inicia una *nueva* molécula de glucógeno? Una curiosa proteína denominada **glucogenina (Fig. 15–32)** es el cebador sobre el que se ensamblan nuevas cadenas y el enzima que catalizado su ensamblaje. El primer paso en la síntesis de una nueva molécula de glucógeno es la transferencia de un residuo de glucosa desde la UDP-glucosa al grupo hidroxilo de la Tyr^{194} de la glucogenina catalizado por la actividad glucosiltransferasa intrínseca de la proteína **(Fig. 15–33)**. La cadena naciente se extiende mediante la adición secuencial de otros siete residuos de glucosa, cada uno de ellos provenientes de la UDP-glucosa; las reacciones son catalizadas por la actividad de alargamiento de la cadena de la glucogenina. En este punto la glucógeno sintasa toma el relevo continuando la extensión de la cadena de glucógeno. La glucogenina permanece sepultada dentro de la partícula **β**, unida de forma covalente al único extremo reductor de la molécula de glucógeno (Fig. 15–33b).

FIGURA 15–32 Estructura de la glucogenina. (PDB 1D 1LL2). La glucogenina muscular (M_r 37.000) forma dímeros en solución. En la especie humana se encuentra una segunda isoforma en el hígado, glucogenina-2. El sustrato, UDP-glucosa (mostrado como estructura de bolas y varillas), está unido a un pliegue de Rosmann cerca del extremo amino y a cierta distancia de los residuos Tyr^{194} (turquesa): a 15 Å de la Tyr del mismo monómero y a 12 Å de la Tyr que se encuentra en la otra subunidad. Cada UDP-glucosa está unida a través de sus fosfatos a un ión Mn^{2+} (verde), que es esencial para la catálisis. Se cree que el Mn^{2+} funciona como aceptor de un par electrónico (ácido de Lewis) que estabiliza el grupo saliente, UDP. El enlace glucosídico del producto tiene la misma configuración alrededor del C-1 de la glucosa que el sustrato UDP-glucosa, lo que sugiere que la transferencia de glucosa desde el UDP a la Tyr^{194} tiene lugar en dos pasos. El primer paso es probablemente un ataque nucleofílico por el Asp^{162} (naranja) que forma un intermedio temporal con la configuración invertida. Un segundo ataque nucleofílico por la Tyr^{194} restablece la configuración inicial.



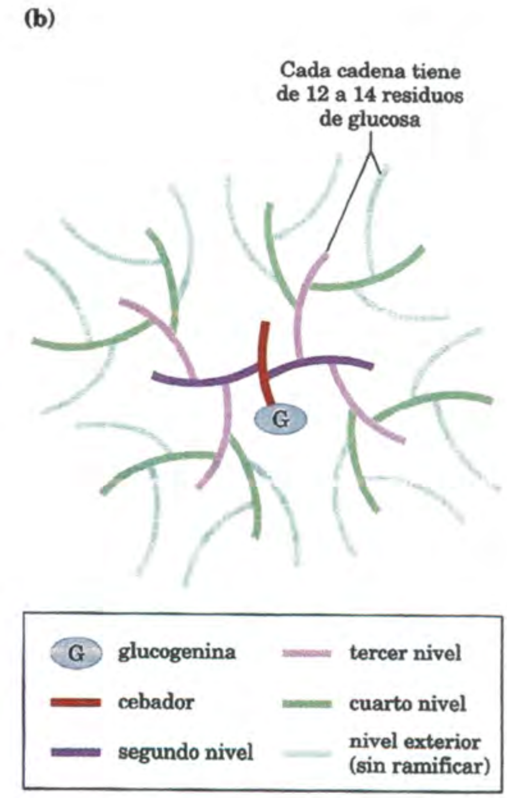


FIGURA 15–33 Glucogenina y estructura de la partícula de glucógeno. (a) La glucogenina cataliza dos reacciones separadas. El ataque inicial por el grupo hidroxilo de la Tyr^{194} sobre el C-1 de la porción glucosilo de la UDP-glucosa da lugar a un residuo de Tyr glucosilado. A continuación se ataca el C-1 de otra molécula de UDP-glucosa por el grupo hidroxilo en C-4 de la glucosa terminal repitiéndose esta secuencia para formar una molécula naciente de glucógeno con ocho residuos glucosa unidos por enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 4$). **(b)** Estructura de la partícula de glucógeno. Empezando con una molécula de glucogenina central, se extienden cadenas de glucógeno (12 a 14 residuos) en zonas. Las cadenas interiores tienen dos ramificaciones ($\alpha 1 \rightarrow 6$) cada una. Las cadenas del nivel exterior no están ramificadas. En una partícula de glucógeno madura hay 12 niveles (aquí sólo se muestran 5) que contienen unos 55.000 residuos de glucosa en una molécula de unos 21 nm de diámetro y $M_r \sim 1 \times 10^7$.

RESUMEN 15.4 Metabolismo del glucógeno en animales

- El glucógeno se almacena en el músculo y en el hígado en forma de grandes partículas. Dentro de las partículas se encuentran los enzimas que metabolizan el glucógeno, así como los enzimas reguladores.
- La glucógeno fosforilasa cataliza la escisión fosforolítica en los extremos no reductores de las cadenas de glucógeno con producción de glucosa 1-fosfato. El enzima desramificante transfiere ramas a las cadenas principales y libera el residuo del punto de ramificación ($\alpha 1 \rightarrow 6$) como glucosa libre.
- La fosfoglucomutasa interconvierte glucosa 1-fosfato y glucosa 6-fosfato. La glucosa 6-fosfato puede entrar en la glucólisis o, en el hígado, puede convertirse en glucosa libre por acción de la glucosa 6-fosfatasa del retículo endoplasmático, siendo a continuación liberada para reponer la glucosa sanguínea.
- El nucleótido–azúcar UDP-glucosa dona residuos de glucosa al extremo no reductor del glucógeno en la reacción catalizada por la glucógeno sintasa. Un enzima ramificador produce los enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 6$) de los puntos de ramificación.
- Las nuevas partículas de glucógeno se inician con la formación autocatalítica de un enlace glucosídico entre la glucosa de la UDP-glucosa y un residuo Tyr de la proteína glucogenina, seguida de la adición de varios residuos de glucosa para formar un cebador sobre el que ya puede actuar la glucógeno sintasa.

15.5 Regulación coordinada de la síntesis y degradación del glucógeno

Tal como ya hemos visto la movilización del glucógeno almacenado se consigue gracias a la glucógeno fosforilasa que degrada el glucógeno a glucosa 1-fosfato (Fig. 15–25). La glucógeno fos-

forilasa es un caso especialmente instructivo de regulación enzimática. Fue uno de los primeros ejemplos conocidos de un enzima regulado alostéricamente y el primer enzima del que se demostró que estaba regulado por fosforilación reversible. También fue uno de los primeros enzimas alostéricos del que se obtuvieron las estructuras tridimensionales de las formas activa e inactiva mediante estudios cristalográficos por rayos X. La glucógeno fosforilasa también ilustra sobre cómo los isozimas juegan sus papeles con especificidad de tejido.

La glucogéno fosforilasa está sujeta a control alostérico y hormonal

Earl W. Sutherland, Jr., 1915–1974

A finales de la década de 1930, Carl y Gerty Cori (Recuadro 15–4) descubrieron que la glucógeno fosforilasa del músculo esquelético se presenta en dos formas interconvertibles: una forma catalíticamente activa, la **glucógeno fosforilasa *a*,** y la **glucógeno fosforilasa *b*,** que es menos activa **(Fig. 15–34)**. Estudios posteriores realizados por Earl Sutherland mostraron que la fosforilasa *b* predomina en el músculo en reposo, pero durante el ejercicio vigoroso la adrenalina desencadena la fosforilación de un residuo Ser específico de la fosforilasa *b*, convirtiéndola en la forma más activa fosforilasa *a*. (Obsérvese que la glucógeno fosforilasa se denomina a menudo simplemente fosforilasa, honor que se debe al hecho de que fue la primera fosforilasa descubierta; el nombre abreviado ha persistido tanto en el uso común como en la bibliografía.)

El enzima (fosforilasa *b* quinasa) responsable de la activación de la fosforilasa mediante la transferencia de un grupo fosforilo a su residuo Ser está activada al mismo tiempo por la adrenalina o el glucagón a través de una serie de pasos que se muestran en la **Figura 15–35**. Sutherland descubrió el segundo mensajero cAMP, que aumenta su concentración en respuesta a la estimulación por adrenalina (en el músculo) o por glucagón (en el hígado). La elevada [cAMP] inicia una **cascada enzimática,** en la que un catalizador activa otro catalizador (véase la Sección 12.1). Tales cascadas permiten una gran amplificación de la señal inicial (véanse los recuadros rosas de la Fig. 15–35). El aumento en la [cAMP] activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA). A continuación la PKA fosforila y activa a la **fosforilasa *b* quinasa,** que se encarga de catalizar la fosforilación de residuos Ser en cada una de las dos subunidades idénticas de la glucógeno fosforilasa, activándola y, de este modo, estimulando la degradación de glucógeno. Esto proporciona en el músculo combustible para que la glucólisis mantenga la contracción muscular para la respuesta del individuo de luchar o huir señalada por la adrenalina. En el hígado, la degradación del glucógeno combate la baja concentración de glucosa sanguínea señalada por el glucagón, liberando glucosa. Estos papeles diferentes quedan reflejados en diferencias sutiles de los mecanismos de regulación en el músculo y en el hígado. Las glucógeno fosforilasas del hígado y del músculo son isozimas codificados por genes diferentes y que difieren en sus propiedades reguladoras.

En el músculo, además de la regulación de la fosforilasa mediante la modificación covalente, existen dos mecanismos de control alostéricos (Fig. 15–35). El Ca^{2+}, la señal para la contracción muscular, se une a la fosforilasa *b* quinasa y la activa, provocando la conversión de la fosforilasa *b* en la forma *a* activa. El Ca^{2+} se une a la fosforilasa *b* quinasa a través de su subunidad δ que es la calmodulina (véase la Fig. 12–11). El AMP, que se acumula durante el ejercicio muscular vigoroso como consecuencia de la degradación del ATP, se une a la fosforilasa activándola y acelerando la liberación de glucosa 1-fosfato a partir del glucógeno. Cuando los niveles de ATP son los adecuados, el ATP bloquea el sitio alostérico al que se une el AMP, inactivando a la fosforilasa.

Cuando el músculo vuelve al reposo, un segundo enzima, **fosforilasa *a* fosfatasa,** también denominado **fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1),** elimina los grupos fosforilo de la fosforilasa *a*, convirtiéndola en la forma menos activa, fosforilasa *b*.

Al igual que el enzima muscular, la glucógeno fosforilasa hepática está regulada hormonalmente (por fosforilación/desfosforilación) y por mecanismos alostéricos. La forma desfosforilada es prácticamente inactiva. Cuando los niveles de glucosa en sangre son demasiado bajos, el glucagón (mediante el mismo

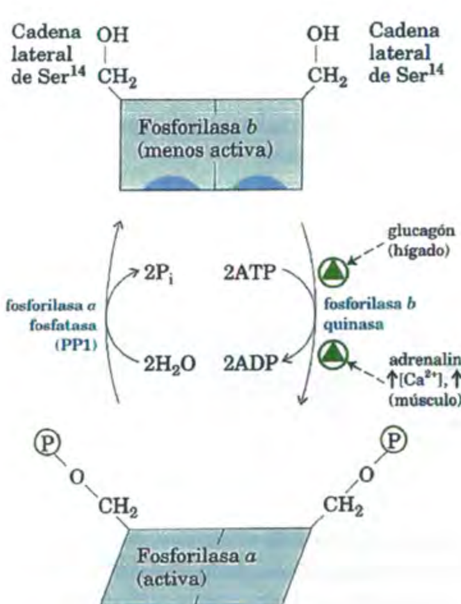


FIGURA 15–34 Regulación de la glucógeno fosforilasa de músculo por modificación covalente. En la forma más activa del enzima, fosforilasa *a*, los residuos Ser^{14}, uno en cada subunidad, están fosforilados. La fosforilasa *a* se convierte en la forma menos activa, fosforilasa *b*, por pérdida enzimática de estos grupos fosforilo, catalizada por la fosforilasa *a* fosfatasa (también conocida como fosfoproteína fosfatasa 1, PP1). La fosforilasa *b* se puede reconvertir (reactivar) a fosforilasa *a* por acción de la fosforilasa *b* quinasa. (Véase también la Fig. 6–36 sobre la regulación de la glucógeno fosforilasa.)

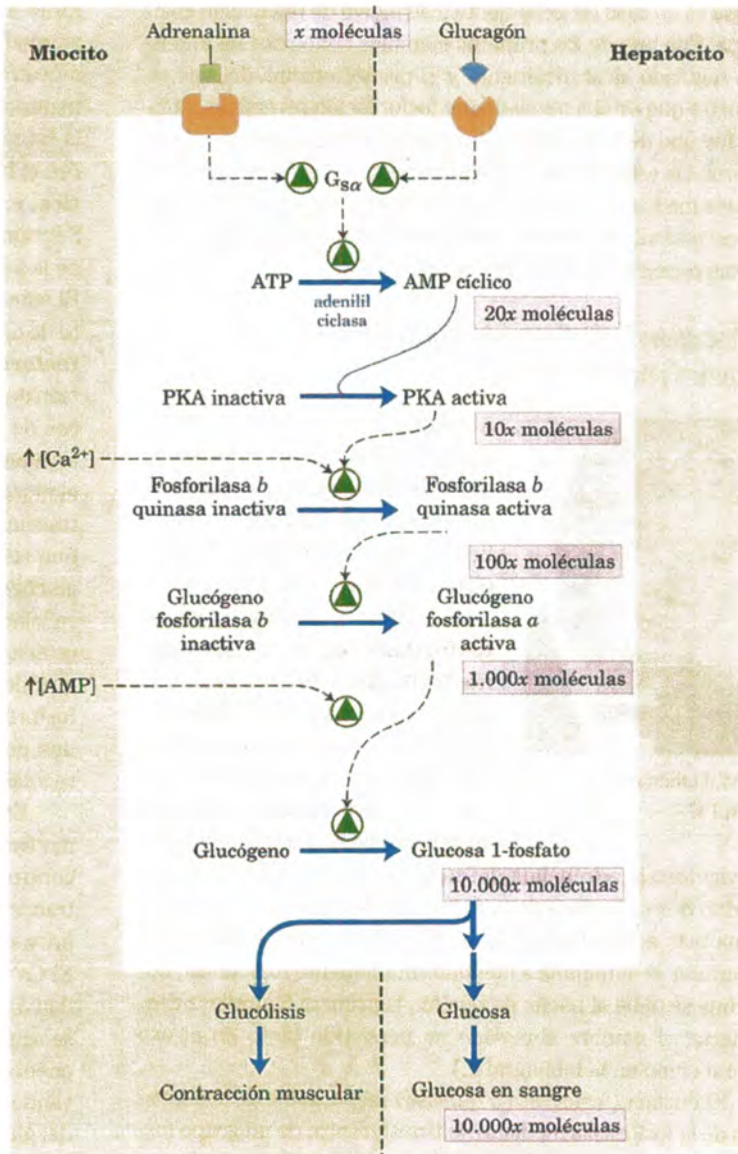


FIGURA 15–35 Mecanismo de cascada de la acción de la adrenalina y del glucagón. Al unirse a receptores de superficie específicos, tanto la adrenalina que actúa sobre un miocito (izquierda) como el glucagón que actúa sobre un hepatocito (derecha) activan una proteína fijadora de GTP, la $G_{s\alpha}$ (véase la Fig. 12–4). La $G_{s\alpha}$ activa provoca un aumento en la [cAMP], activando la PKA. Esto pone en marcha una cascada de fosforilaciones; la PKA activa la fosforilasa *b* quinasa, la cual activa entonces la glucógeno fosforilasa. Tales cascadas efectúan una gran amplificación de la señal inicial; las cifras en los recuadros rosas son probablemente estimaciones bajas del incremento real en el número de moléculas en cada paso de la cascada. La degradación resultante del glucógeno proporciona glucosa, que en el miocito puede suministrar ATP (vía glucólisis) para la contracción muscular y en el hepatocito se libera a la sangre para contrarrestar la baja concentración de glucosa en la misma.

mecanismo de cascada mostrado en la Fig. 15–35) activa la fosforilasa *b* quinasa, que, a su vez, convierte la fosforilasa *b* en su forma *a* activa, iniciando la liberación de glucosa a la sangre. Cuando los niveles de glucosa en sangre vuelven a la normalidad, la glucosa entra en los hepatocitos y se une a un sitio alostérico inhibidor de la fosforilasa *a*. Esta unión también produce un cambio de conformación que expone los residuos Ser fosforilados a la PP1, que cataliza su desfosforilación e inactiva la fosforilasa **(Fig. 15–36)**. El sitio alostérico para la glucosa permite que la glucógeno fosforilasa actúe como su propio sensor de la glucosa y que responda adecuadamente a cambios en la concentración de glucosa sanguínea.

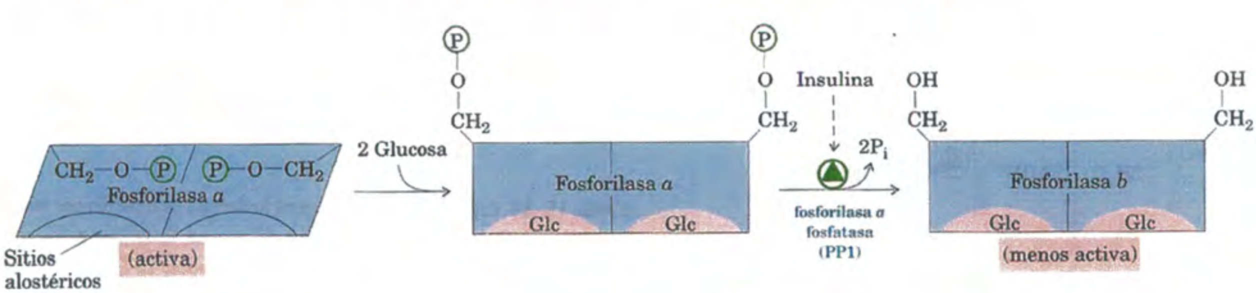


FIGURA 15–36 La glucógeno fosforilasa hepática es un sensor de la glucosa. La fijación de la glucosa a un sitio alostérico del isozima hepático de la fosforilasa *a* induce un cambio conformacional que expone sus residuos Ser fosforilados a la acción de la fosforilasa *a* fosfatasa (PP1). Esta fosfatasa convierte la fosforilasa *a* en fosforilasa *b*, reduciendo drásticamente la actividad de la fosforilasa y haciendo que la degradación del glucógeno sea más lenta en respuesta a una glucosa sanguínea alta. La insulina también actúa indirectamente para estimular la PP1 y hacer más lenta la degradación del glucógeno.

La glucógeno sintasa también está regulada por fosforilación y desfosforilación

Del mismo modo que la glucógeno fosforilasa, la glucógeno sintasa puede existir en las formas fosforilada y desfosforilada **(Fig. 15–37)**. Su forma activa, **glucógeno sintasa *a*,** está sin fosforilar. La fosforilación de los hidroxilos de las cadenas laterales de varios residuos Ser de ambas subunidades transforma la glucógeno sintasa *a* en la **glucógeno sintasa *b*,** que es inactiva a menos que esté presente su activador alostérico glucosa 6-fosfato. La glucógeno sintasa es notable por su capacidad de ser fosforilada en varios residuos por al menos 11 proteína quinasas diferentes. La quinasa reguladora más importante es la **glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3),** que añade grupos fosforilo a tres residuos Ser cerca del carboxilo terminal de la glucógeno sintasa, lo que produce una fuerte inactivación. La acción de la GSK3 es jerárquica; no puede fosforilar la glucógeno sintasa hasta que otra proteína quinasa, la **caseína quinasa II (CKII),** ha fosforilado en primer lugar la glucógeno sintasa en un residuo cercano, hecho que se denomina **cebado (Fig. 15–38a)**.

En el hígado la conversión de la glucógeno sintasa *b* a la forma activa está promovida por la PP1, la cual está unida a la partícula de glucógeno. La PP1 elimina los grupos fosforilo de los tres residuos de Ser fosforilados por la GSK3. La glucosa

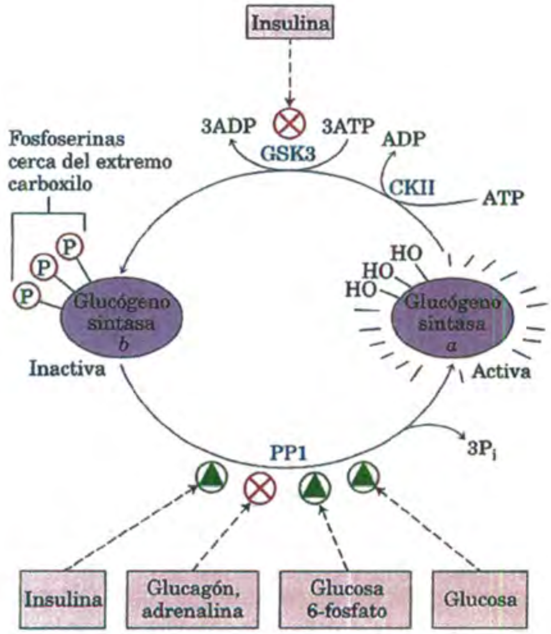


FIGURA 15–37 Efectos de GSK3 sobre la actividad glucógeno sintasa. La glucógeno sintasa *a*, la forma activa, tiene tres residuos Ser cerca de su extremo carboxilo que son fosforilados por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Esto convierte la glucógeno sintasa en la forma inactiva (*b*) (GSb). La acción de la GSK3 requiere una fosforilación previa (cebado) por la caseína quinasa (CKII). La insulina desencadena la activación de la glucógeno sintasa *b* bloqueando la actividad de la GSK3 (véase la ruta de esta acción en la Fig. 12–16) y activando una fosfoproteína fosfatasa (PP1 en el músculo, otra fosfatasa en el hígado). En el músculo la adrenalina activa la PKA, que fosforila la proteína señalizadora del glucógeno G_M (véase la Fig. 15–40) en un sitio que produce la disociación de la PP1 del glucógeno. La glucosa 6-fosfato favorece la desfosforilación de la glucógeno sintasa al unirse a ella y promover una conformación que es un buen sustrato de la PP1. La glucosa también promueve la desfosforilación; la unión de glucosa a la glucógeno fosforilasa a fuerza un cambio de conformación que favorece la desfosforilación a glucógeno fosforilasa *b*, eliminando así su inhibición de la PP1 (véase la Fig. 15–39).

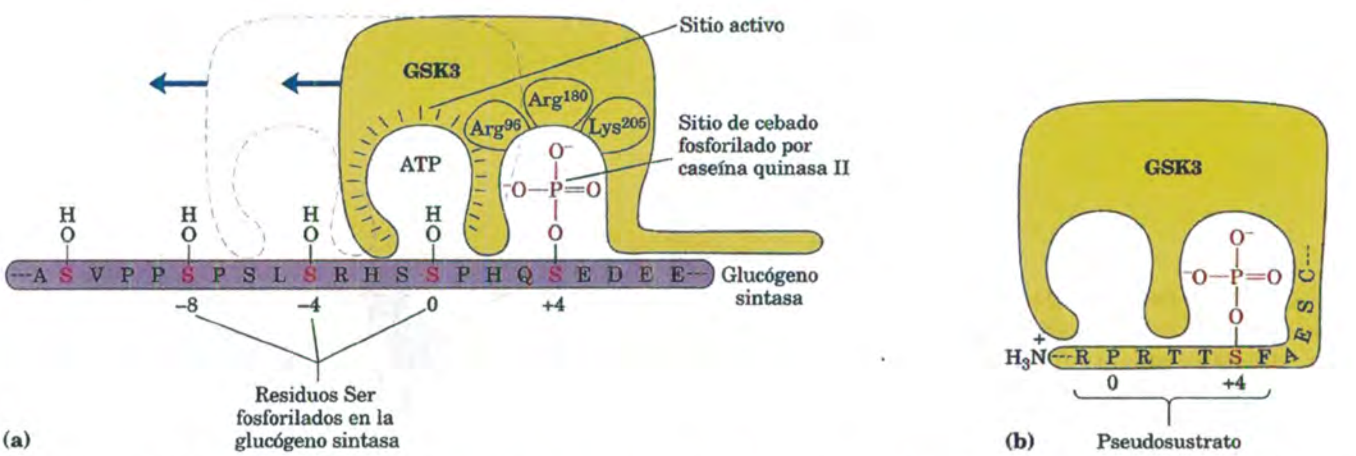


FIGURA 15–38 Cebado de la fosforilación de la glucógeno sintasa por la GSK3. (a) La glucógeno sintasa quinasa 3 se asocia primeramente con su sustrato (glucógeno sintasa) mediante la interacción entre tres residuos cargados positivamente (Arg^{96}, Arg^{180}, Lys^{205}) y un residuo fosfoserina en la posición +4 del sustrato. (Para orientación, al residuo Ser o Thr que se ha de fosforilar en el sustrato se le asigna el índice 0; los residuos del lado amino-terminal de este residuo se numeran −1, −2, y así sucesivamente; los residuos sobre el lado carboxi-terminal se numeran +1, +2, etc.) Esta asociación alinea el sitio activo del enzima con un residuo Ser en la posición 0, al que fosforila. Esto crea un nuevo sitio de cebado y el enzima se desplaza por la proteína para fosforilar el residuo Ser en la posición −4 y a continuación la Ser en −8. **(b)** La GSK3 tiene un residuo Ser cerca de su extremo amino que puede ser fosforilado por la PKA o por la PKB (véase la Fig. 15–39). Esto produce una región "pseudosustrato" en GSK3 que se pliega dando un sitio cebador que hace que el sitio activo sea inaccesible a otra proteína sustrato, inhibiendo la GSK3 hasta que el grupo fosforilo de cebado de su región pseudosustrato es eliminado por la PP1. Otras proteínas que son sustrato de la GSK3 también tienen un sitio de cebado en la posición +4, que ha de ser fosforilado por otra proteína quinasa antes de que la GSK3 pueda actuar sobre ellas. (Véanse también las Figs. 6–37 y 12–22b sobre la regulación de la glucógeno sintasa.)

6-fosfato se une a un sitio alostérico de la glucógeno sintasa *b*, con lo que consigue que el enzima sea un sustrato mejor para la desfosforilación por la PP1, logrando así su activación. Por analogía con la glucógeno fosforilasa, que actúa como un sensor de glucosa, se puede considerar a la glucógeno sintasa como un sensor de glucosa 6-fosfato. En el músculo, una fosfatasa diferente podría tener el papel desempeñado por la PP1 en el hígado, activando a la glucógeno sintasa por desfosforilación.

La glucógeno sintasa quinasa 3 interviene en algunas acciones de la insulina

Tal como se vio en el Capítulo 12, una de las vías mediante las que la insulina desencadena cambios intracelulares es la activación de una proteína quinasa (PKB) que, a su vez, fosforila e inactiva la GSK3 (**Fig. 15–39**; véase también la Fig. 12–16). La fosforilación de un residuo Ser cerca del extremo amino de la GSK3 convierte esa región de la proteína en un pseudosustrato que se pliega en el sitio activo donde normalmente debería unirse el residuo Ser fosforilado que actúa como cebador (Fig. 15–38b). Esto impide que la GSK3 se una al sitio de cebado de un sustrato real, inactivando así el enzima y desplazando el equilibrio a favor de la desfosforilación de la glucógeno sintasa por la PP1. La glucógeno fosforilasa también puede afectar a la fosforilación de la glucógeno sintasa: la glucógeno fosforilasa activa inhibe directamente la PP1, impidiendo que active la glucógeno sintasa (Fig. 15–37).

Aunque el primer papel que se descubrió de la GSK3 fue en el metabolismo del glucógeno (de ahí el nombre de glucógeno sintasa quinasa), este enzima tiene claramente un papel más amplio que el de la regulación de la glucógeno sintasa. Interviene en la transmisión de señales de la insulina y otros factores de crecimiento y nutrientes, y actúa en la especificación de los destinos celulares durante el desarrollo embrionario. Entre sus dianas se encuentran proteínas del citoesqueleto y proteínas esenciales para la síntesis de mRNA y de proteínas. Estas dianas, lo mismo que la glucógeno sintasa, han de experimentar previamente una fosforilación cebadora por otra proteína quinasa antes de que puedan ser fosforiladas por la GSK3.

La fosfoproteína fosfatasa 1 es clave para el metabolismo del glucógeno

Un solo enzima, la PP1, puede eliminar grupos fosforilo de los tres enzimas fosforilados como respuesta al glucagón (hígado) y a la adrenalina (hígado y músculo): fosforilasa quinasa, glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa. La insulina estimula la síntesis de glucógeno al activar la PP1 e inactivar la GSK3.

La fosfoproteína fosfatasa 1 no se encuentra libre en el citosol, sino que está fuertemente unida a sus proteínas diana por un miembro de una familia de **proteínas de señalización del glucógeno** que unen el glucógeno y cada uno de los tres enzimas glucógeno fosforilasa, fosforilasa quinasa y glucógeno sintasa (**Fig. 15–40**). La propia PP1 también está sujeta a regulación covalente y alostérica; se inactiva cuando es fosforilada por la PKA y se activa alostéricamente por la glucosa 6-fosfato.

El metabolismo glucídico está globalmente coordinado por señales alostéricas y hormonales

Una vez analizados los mecanismos que regulan los enzimas individuales, podemos considerar ahora los desplazamientos globales del metabolismo glucídico que tienen lugar en el estado de buena alimentación, durante el ayuno y en la respuesta de luchar o huir señaladas por la insulina, el glucagón y la adrenalina, respectivamente. Hemos de comparar dos casos en los que la regulación tiene objetivos diferentes: (1) el papel de los hepatocitos en el suministro de glucosa a la sangre y (2) la utilización egoísta de combustibles glucídicos por tejidos no hepáticos, tipificados por el músculo esquelético (el miocito), para sostener sus propias actividades.

Después de la ingestión de una comida rica en glúcidos, la elevación de la glucosa sanguínea desencadena la liberación de insulina (**Fig. 15–41**, parte superior). En un hepatocito, la insu-

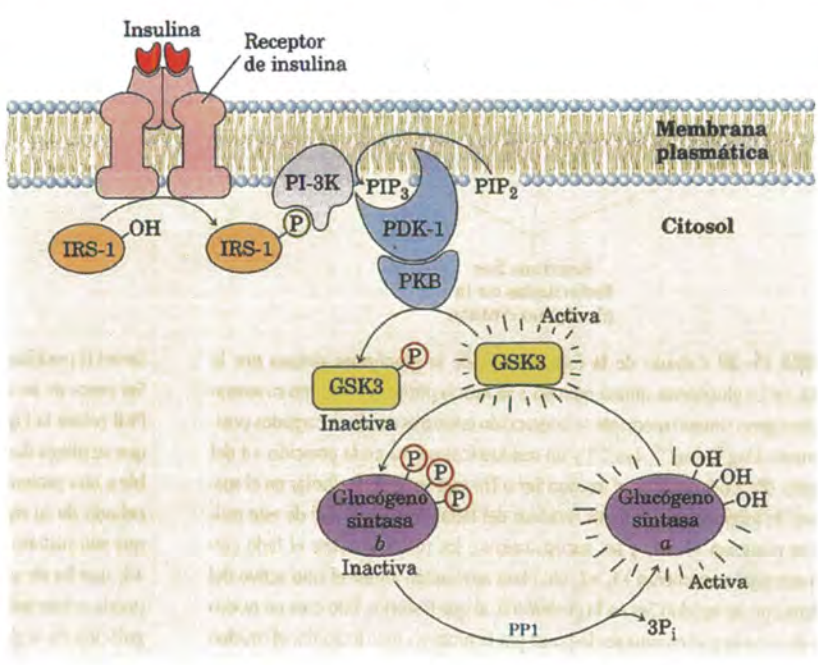


FIGURA 15–39 Ruta desde la insulina a la GSK3 y a la glucógeno sintasa. La unión de la insulina a su receptor activa una tirosina proteína quinasa en el receptor, la cual fosforila el sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1). A continuación la fosfotirosina de esta proteína se une a la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K) que convierte el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) de la membrana en fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3). Una proteína quinasa (PDK-1) que es activada por la unión de PIP_3 activa una segunda proteína quinasa (PKB), la cual fosforila la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) en su región pseudosustrato inactivándola mediante el mecanismo que se muestra en la Figura 15–38b. La inactivación de la GSK3 permite que la fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1) desfosforile la glucógeno sintasa, convirtiéndola en su forma activa. Así, la insulina estimula la síntesis de glucógeno. (Véase la Fig. 12–16 para más detalles sobre la acción de la insulina.)

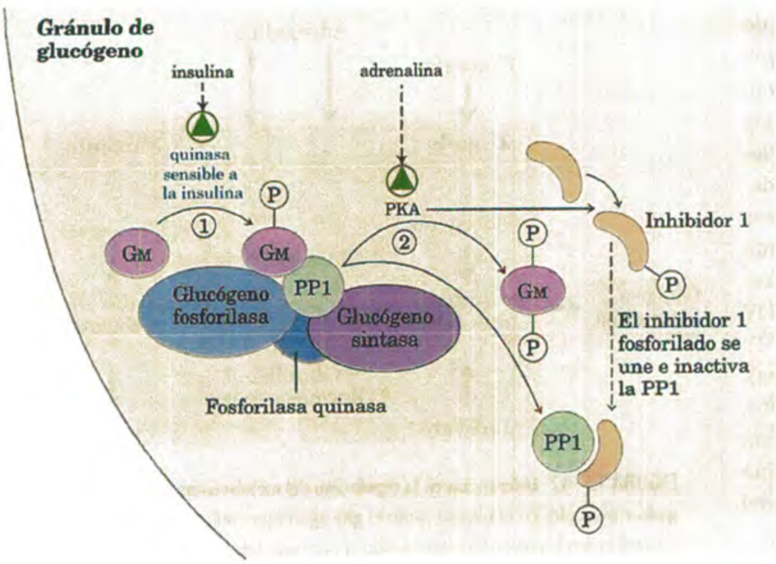


FIGURA 15–40 Proteína de señalización del glucógeno GM. La proteína de señalización del glucógeno GM forma parte de una familia de proteínas que unen otras proteínas (incluida la PP1) a las partículas de glucógeno. La GM se puede fosforilar en dos posiciones diferentes en respuesta a la insulina o a la adrenalina. ① La fosforilación estimulada por insulina del sitio 1 de la GM activa la PP1, la cual desfosforila la fosforilasa quinasa, la glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa (no mostrado). ② La fosforilación estimulada por la adrenalina del sitio 2 de la GM produce la disociación de la PP1 de la partícula de glucógeno, impidiendo el acceso a la glucógeno fosforilasa y a la glucógeno sintasa. La PKA también fosforila una proteína (inhibidor 1) que, cuando está fosforilada, inhibe la PP1. De este modo la insulina inhibe la degradación del glucógeno y estimula su síntesis, mientras que la adrenalina (o el glucagón en el hígado) tiene el efecto opuesto.

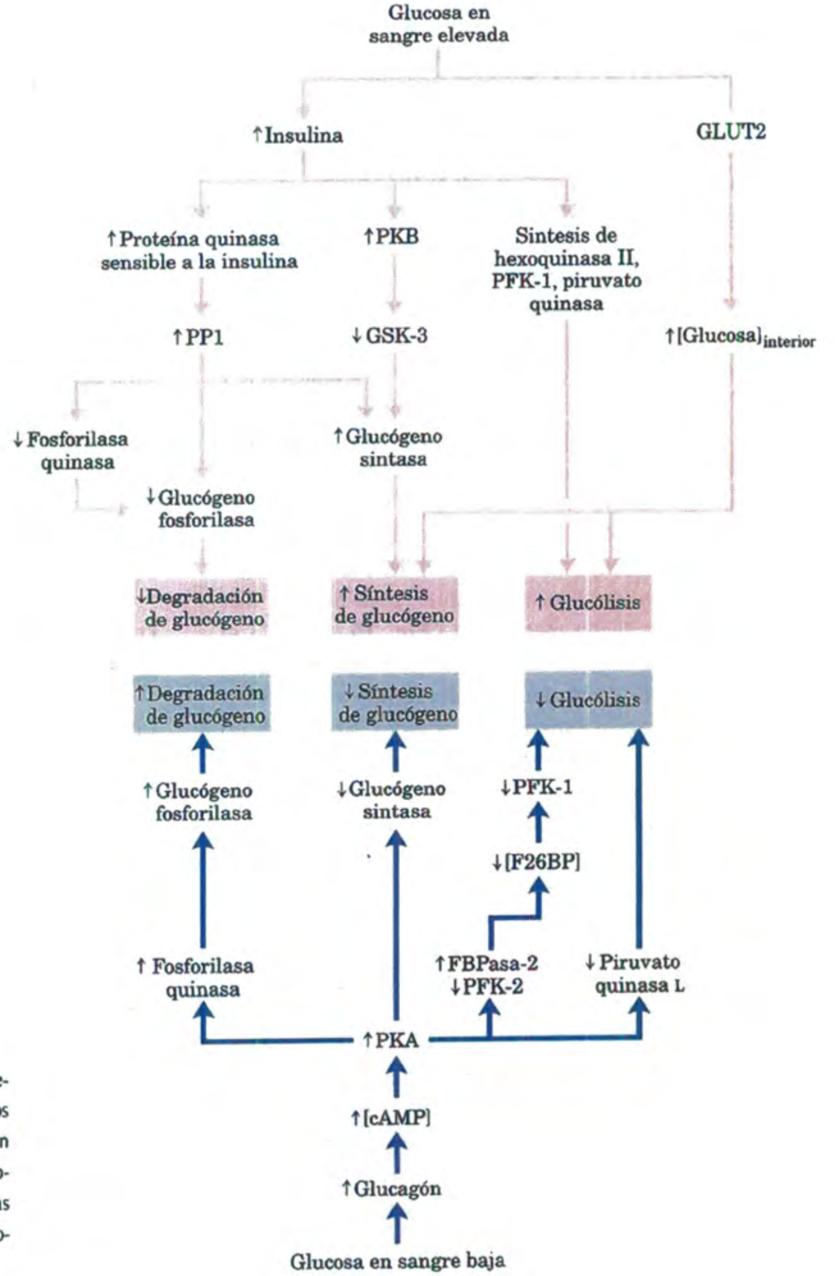


FIGURA 15–41 Regulación del metabolismo glucídico en el hepatocito. Las flechas indican la relación causal entre los cambios que conectan. Por ejemplo, una flecha de ↓A a ↑B indica que un descenso de A produce un incremento de B. Las flechas rosas conectan efectos resultantes de una elevada glucosa sanguínea; las flechas azules conectan los efectos resultantes de una baja glucosa sanguínea.

lina tiene dos efectos inmediatos: inactiva la GSK3, a través de la cascada mostrada en la Figura 15–39, e inactiva una proteína fosfatasa, probablemente la PP1. Estas dos acciones activan completamente la glucógeno sintasa. La PP1 también inactiva la glucógeno fosforilasa *a* y la fosforilasa quinasa por desfosforilación de ambas, deteniendo así de manera efectiva la degradación del glucógeno. La glucosa entra en el hepatocito a través del transportador de alta capacidad GLUT2, siempre presente en la membrana plasmática, y la elevada concentración intracelular de glucosa conduce a la disociación de la hexoquinasa IV (glucoquinasa) de su proteína reguladora nuclear (Fig. 15–13). La hexoquinasa IV entra en el citosol y fosforila la glucosa, estimulando la glucólisis y suministrando el precursor para la síntesis de glucógeno. En estas condiciones, los hepatocitos utilizan el exceso de glucosa de la sangre para sintetizar glucógeno hasta el límite de aproximadamente el 10% del peso total del hígado.

Entre comidas, o durante un ayuno prolongado, la disminución de la glucosa sanguínea provoca la liberación de glucagón, el cual, a través de la cascada mostrada en la Figura 15–35, activa la PKA. Ésta interviene en todos los efectos del glucagón (Figura 15–41, parte inferior). Fosforila la fosforilasa quinasa activándola, lo que lleva a la activación de la glucógeno fosforilasa. Fosforila la glucógeno sintasa inactivándola y bloquea, por tanto, la síntesis de glucógeno. Fosforila la PFK-2/FBPasa-2, lo que lleva a la disminución de la concentración del regulador fructosa 2,6-bisfosfato, que a su vez tiene como efecto la inactivación del enzima glucolítico PFK-1 y la activación del enzima gluconeogénico FBPasa-1. Finalmente también fosforila e inactiva el enzima glucolítico piruvato quinasa. En estas condiciones, el hígado produce glucosa 6-fosfato por degradación del glucógeno y por gluconeogénesis y deja de utilizar glucosa para alimentar la glucólisis o producir glucógeno, con lo que se maximiza la cantidad de glucosa que se libera a la sangre. Esta liberación de glucosa sólo es posible en el hígado, ya que los demás tejidos carecen de glucosa 6-fosfatasa (Fig. 15–28).

La fisiología del músculo esquelético difiere de la del hígado en tres aspectos que son importantes para nuestra discusión sobre la regulación metabólica **(Fig. 15–42)**: (1) el músculo utiliza su glucógeno almacenado solamente para sus propias necesidades; (2) cuando pasa del reposo a la contracción vigorosa, el músculo experimenta grandes variaciones en la demanda de ATP, que son proporcionadas por la glucólisis, y (3) el músculo carece de la dotación enzimática para la gluconeogénesis. La regulación del metabolismo glucídico en el músculo refleja estas tres diferencias respecto del hígado. En primer lugar, los miocitos carecen de receptores para el glucagón. En segundo lugar, el isozima muscular de la piruvato quinasa no es fosforilado por la PKA, por lo que no se detiene la glucólisis cuando la [cAMP] es elevada. De hecho, la cAMP *aumenta* la velocidad de la glucólisis en el músculo, probablemente por activación de la glucógeno fosforilasa. Cuando se libera adrenalina a la sangre en una situación de lucha o huida, se activa la PKA por el aumento de la [cAMP], con lo que se fosforila y activa la glucógeno fosforilasa quinasa. La fosforilación y activación resultantes de la glucógeno fosforilasa provoca una degradación más rápida del glucógeno. La adrenalina no se libera en condiciones de bajo estrés, pero con cada estimulación neuronal de la contracción muscular se eleva brevemente la

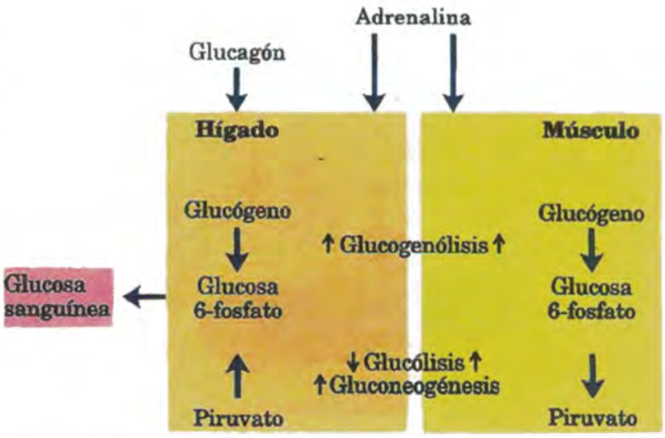


FIGURA 15–42 Diferencias en la regulación del metabolismo glucídico en hígado y músculo. En el hígado, tanto el glucagón (que indica baja glucosa sanguínea) como la adrenalina (que señala la necesidad de luchar o huir) tienen el efecto de maximizar la salida de glucosa al torrente circulatorio. En el músculo, la adrenalina aumenta la degradación del glucógeno y la glucólisis que, conjuntamente, proporcionan combustible para producir el ATP necesario para la contracción muscular.

$[Ca^{2+}]$ citosólica que activa la fosforilasa quinasa a través de su subunidad de calmodulina.

La concentración elevada de insulina desencadena un aumento de la síntesis de glucógeno en los miocitos por activación de la PP1 e inactivación de la GSK3. A diferencia de los hepatocitos, los miocitos tienen una reserva de GLUT4 secuestrada en vesículas intracelulares. La insulina provoca su desplazamiento a la membrana plasmática (véase la Fig. 12–16), en donde colaboran a una mayor captación de glucosa. Por tanto, en respuesta a la insulina, los miocitos ayudan a disminuir la glucosa sanguínea al incrementar sus velocidades de captación de glucosa, de síntesis de glucógeno y de glucólisis.

El metabolismo de glúcidos y de lípidos está integrado mediante mecanismos hormonales y alostéricos

Compleja como es la regulación del metabolismo glucídico, no deja de ser sólo una parte del metabolismo energético global. El metabolismo de las grasas y de los ácidos grasos está ligado muy estrechamente al de los glúcidos. Señales hormonales tales como la insulina y cambios en la dieta o en el ejercicio son igualmente importantes en la regulación del metabolismo de las grasas y en su integración con el de los glúcidos. Volveremos a esta integración metabólica global en los mamíferos en el Capítulo 23, después de considerar las rutas metabólicas de las grasas y los aminoácidos (Capítulos 17 y 18). El mensaje que deseamos transmitir aquí es que las rutas metabólicas están sujetas a controles reguladores complejos que son muy sensibles a cambios en las circunstancias metabólicas. Estos mecanismos actúan para ajustar el flujo de metabolitos a través de las diversas rutas metabólicas según las necesidades de la célula y el organismo, y lo realizan sin producir cambios importantes en las concentraciones de los intermediarios compartidos con otras rutas.

RESUMEN 15.5 Regulación coordinada de la síntesis y degradación del glucógeno

- La glucógeno fosforilasa se activa en respuesta al glucagón o a la adrenalina, que aumentan la [cAMP] y activan la PKA. Ésta fosforila y activa la fosforilasa quinasa, que transforma la glucógeno fosforilasa *b* a su forma activa *a*. La fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1) invierte la fosforilación de la glucógeno fosforilasa *a*, inactivándola. La glucosa se une al isozima hepático de la glucógeno fosforilasa *a* favoreciendo de esta manera su desfosforilación e inactivación.
- La glucógeno sintasa *a* es inactivada por fosforilación catalizada por la GSK3. La insulina bloquea la GSK3. La PP1, que es activada por la insulina, invierte la inhibición al desfosforilar la glucógeno sintasa *b*.
- La insulina aumenta la captación de glucosa por parte de los miocitos y adipocitos, desencadenando el desplazamiento del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática.
- La insulina estimula la síntesis de las hexoquinasas II y IV, de la PFK-1, de la piruvato quinasa y de varios enzimas implicados en la síntesis de lípidos. La insulina también estimula la síntesis de glucógeno en el músculo y en el hígado.
- En el hígado, el glucagón estimula la degradación de glucógeno y la gluconeogénesis al tiempo que bloquea la glucólisis, ahorrando de este modo glucosa para su exportación al cerebro y otros tejidos.
- En el músculo, la adrenalina estimula la degradación del glucógeno y la glucólisis, proporcionando ATP para la contracción muscular.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

glucosa 6-fosfato 569
flujo 571
homeostasis 571
diferenciación celular 571
factor de transcripción 571
elemento de respuesta 571
recambio 572
transcriptoma 572
proteoma 572
metaboloma 573
regulación metabólica 574
control metabólico 574
cociente de acción de masas, *Q* 574
adenilato quinasa 576
proteína quinasa activada por AMP (AMPK) 576
coeficiente de control de flujo, *C* 578
flujo, *J* 578
coeficiente de elasticidad, ε 580
coeficiente de respuesta, *R* 581
gluconeogénesis 582
ciclo inútil 582
ciclo de sustrato 583
hexoquinasa II 583
hexoquinasa I 583
hexoquinasa IV 584
GLUT2 584
glucagón 587
fructosa 2,6-bisfosfato 587
fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) 588
fructosa 2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2) 588
proteína de unión a los elementos de respuesta glucídica (ChREBP) 591
proteína de unión a los elementos de respuesta a esteroles (SREBP) 592
proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB) 592
forkhead box other (FOXO1) 592
glucogenólisis 595
glucogénesis 595
glucosa 1-fosfato 595
enzima desramificante 596
oligo ($\alpha 1 \rightarrow 6$) a ($\alpha 1 \rightarrow 4$) glucanotransferasa 596
fosfoglucomutasa 596
nucleótidos-azúcar 596
UDP-glucosa pirofosforilasa 600
amilo ($1 \rightarrow 4$) a ($1 \rightarrow 6$) transglucosilasa 601
glucogenina 601
glucógeno fosforilasa *a* 603
glucógeno fosforilasa *b* 603
cascada enzimática 603
fosforilasa *b* quinasa 603
fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1) 603
glucógeno sintasa *a* 605
glucógeno sintasa *b* 605
glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) 605
caseína quinasa II (CKII) 605
cebado 605
proteínas de señalización del glucógeno 606
criocompresión 611

Bibliografía

Regulación de las rutas metabólicas

Desvergne, B., Michalik, L., & Wahli, W. (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.
Revisión avanzada y comprensiva.

Gibson, D. & Harris, R.A. (2001) *Metabolic Regulation in Mammals*, Taylor & Francis, New York.
Excelente descripción de la regulación del metabolismo de fácil lectura.

Storey, K.B. (ed.). (2004) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Wiley-Liss, Inc., Hoboken, NJ.
Excelente discusión de los principios de la regulación metabólica, la transducción de señales, el control de transcripción y el metabolismo energético en la salud y la enfermedad.

Análisis del control metabólico

Fell, D.A. (1992) Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochem. J.* **286**, 313–330.
Exposición clara de los principios del análisis de control metabólico.

Fell, D.A. (1997) *Understanding the Control of Metabolism*, Portland Press, Ltd., London.
Exposición clara y excelente de la regulación metabólica desde el punto del vista del análisis del control metabólico. Si sólo puede leer un tratado sobre el análisis del control metabólico ha de ser éste.

Heinrich, R. & Rapoport, T.A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains: general properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* **42**, 89–95.
Formulación temprana de los principios del análisis del control metabólico. Véase también el artículo de Kacser & Burns, citado abajo.

Jeffrey, F.M.H., Rajagopal, A., Maloy, C.R., & Sherry, A.D. (1991) ^{13}C-NMR: a simple yet comprehensive method for analysis of intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 5–10.
Revisión breve de nivel intermedio.

Kacser, H. & Burns, J.A. (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **32**, 65–104.

Artículo clásico en este campo. Véase también el artículo de Heinrich y Rapoport, antes citado.

Kacser, H., Burns, J.A., & Fell, D.A. (1995) The control of flux: 21 years on. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 341–366.

Schilling, C.H., Schuster, S., Palsson, B.O., & Heinrich, R. (1999) Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. *Biotechnol. Prog.* **15**, 296–303.

Discusión breve, aunque avanzada, de los tratamientos teóricos que intentan encontrar vías para manipular el metabolismo con el fin de optimizar la formación de productos metabólicos.

Schuster, S., Fell, D.A., & Dandekar, T. (2000) A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nat. Biotechnol.* **18**, 326–332.

Análisis interesante y provocador de la interrelación entre la ruta de las pentosas fosfato y la glucólisis desde un punto de vista teórico.

Westerhoff, H.V., Hofmeyr, J.-H.S., & Kholodenko, B.N. (1994) Getting to the inside of cells using metabolic control analysis. *Biophys. Chem.* **50**, 273–283.

Regulación coordinada de la glucólisis y de la gluconeogénesis

Armoni, M., Harel, C., & Karnieli, E. (2007) Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 100–107.

Barthel, A., Schmoll, D., & Unterman, T.G. (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 183–189.

Revisión de nivel intermedio de los efectos de los factores de transcripción sobre el metabolismo glucídico.

Brady, M.J., Pessin, J.E., & Saltiel, A.R. (1999) Spatial compartmentalization in the regulation of glucose metabolism by insulin. *Trends Endocrinol. Metab.* **10**, 408–413.

Revisión de nivel intermedio.

Carling, D. (2004) The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 18–24.

Revisión de la AMPK y su papel en el metabolismo energético.

de la Iglesia, N., Mukhtar, M., Seoane, J., Guinovart, J.J., & Agius, L. (2000) The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J. Biol. Chem.* **275**, 10,597–10,603.

Descripción de la determinación experimental de los coeficientes de control de flujo para la glucoquinasa y la proteína reguladora de la glucoquinasa en hepatocitos.

Dean, L. & McEntyre, J. (2004) *The Genetic Landscape of Diabetes*, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=diabetes.

Excelente libro de fácil lectura que se puede bajar de la red (gratuita). Incluye una introducción a la diabetes, una historia de los estudios sobre la diabetes y capítulos sobre los factores genéticos en IDDM, NIDDM y MODY.

Desverne, B., Michalik, L., & Wahli, W. (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.

Revisión extensa y avanzada de los factores de transcripción, incluidos los que regulan el metabolismo de glúcidos y grasas.

Hardie, D.G. (2007) AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 185–210.

Revisión avanzada, con énfasis en el posible papel de este enzima en la diabetes tipo II.

Herman, M.A. & Kahn, B.B. (2006) Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J. Clin. Invest.* **116**, 1767–1775.

Revisión a nivel intermedio bellamente ilustrada.

Hers, H.G. & Van Schaftingen, E. (1982) Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* **206**, 1–12.

Descripción clásica de esta molécula reguladora y su papel en la regulación del metabolismo glucídico.

Hue, L. & Rider, M.H. (1987) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* **245**, 313–324.

Jorgensen, S.B., Richter, E.A., & Wojtaszewski, J.F.P. (2006) Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J. Physiol.* **574**, 17–31.

Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D.G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1**, 15–25.

Revisión de nivel intermedio bien ilustrada.

Long, Y.C. & Zierath, J.R. (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* **116**, 1776–1783.

Revisión corta y de nivel avanzado sobre el papel e la AMPK en el metabolismo, que incluye datos en ratones genosuprimidos.

Nordlie, R.C., Foster, J.D., & Lange, A.J. (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 379–406.

Revisión avanzada.

Okar, D.A., Manzano, A., Navarro-Sabate, A., Riera, L., Bartrons, R., & Lange, A.J. (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 30–35.

Pilkis, S.J. & Granner, D.K. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 885–909.

Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.-D., & Girard, J. (2007) ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 179–192.

Revisión avanzada sobre el papel del factor de transcripción ChREBP en el metabolismo glucídico.

Schirmer, T. & Evans, P.R. (1990) Structural basis of the allosteric behavior of phosphofructokinase. *Nature* **343**, 140–145.

Towle, H.C. (2005) Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 489–494.

Revisión de nivel intermedio.

Towler, M.C. & Hardie, D.G. (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* **100**, 328–341.

van Shaftingen, E. & Gerin, I. (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J.* **362**, 513–532.

Veech, R.L. (2003) A humble hexose monophosphate pathway metabolite regulates short- and long-term control of lipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5578–5580.

Corta revisión del trabajo del laboratorio de K. Uyeda sobre el papel de la xilulosa 5-fosfato sobre el metabolismo de glúcidos y grasas; aquí se citan los trabajos de Uyeda.

Yamada, K. & Noguchi, T. (1999) Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem. J.* **337**, 1–11.

Metabolismo del glucógeno en animales

Whelan, W.J. (1976) On the origin of primer for glycogen synthesis. *Trends Biochem. Sci.* **1**, 13–15.

Revisión de nivel intermedio del descubrimiento, propiedades y función de la glucogenina.

Regulación coordinada de la síntesis y degradación del glucógeno

Aiston, S., Hampson, L., Gomez-Foix, A.M., Guinovart, J.J., & Agius, L. (2001) Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 23,858–23,866.

Jope, R.S. & Johnson, G.V.W. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 95–102.

Revisión de nivel intermedio bien ilustrada.

Problemas

1. Determinación de las concentraciones intracelulares de metabolitos La determinación de las concentraciones de intermediarios metabólicos en la célula viva presenta dificultades experimentales. Normalmente se ha de destruir la célula antes de poder medir las concentraciones de los metabolitos. No obstante, debido a que los enzimas catalizan muy rápidamente las interconversiones metabólicas, un problema común asociado con este tipo de determinaciones es que las concentraciones de metabolitos determinadas no reflejan las concentraciones fisiológicas sino las de equilibrio. Una técnica experimental fiable requiere que todas las reacciones catalizadas enzimáticamente se detengan instantáneamente en el tejido intacto de modo que los intermediarios metabólicos no experimenten cambio alguno. Este objetivo se consigue mediante compresión muy rápida del tejido entre grandes placas de aluminio enfriadas con nitrógeno líquido (−190 °C), proceso denominado **criocompresión** (freeze–clamping). Después de congelar, lo que detiene inmediatamente la acción enzimática, se pulveriza el tejido y se inactivan los enzimas mediante precipitación con ácido perclórico. El precipitado se elimina por centrifugación y se analizan los metabolitos en el sobrenadante clarificado. Para calcular la concentración intracelular, se determina el volumen intracelular a partir del contenido total de agua del tejido y de una determinación del volumen extracelular.

Las concentraciones intracelulares de los sustratos y productos de la reacción de la fosfofructoquinasa-1 de tejido cardíaco de rata aislado son las que figuran en la tabla siguiente.

Metabolito	Concentración (μM)*
Fructosa 6-fosfato	87,0
Fructosa 1,6-bisfosfato	22,0
ATP	11.400
ADP	1.320

Fuente: Williamson, J.R., (1965) Glycolytic control mechanism I. Inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in the isolated, perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* **240**, 2308-2321.

*Calculada como μmol/mL de agua intracelular.

(a) Calcule Q, [fructosa 1,6-bisfosfato][ADP]/[fructosa 6-fosfato][ATP], para la reacción de la PKF-1 en condiciones fisiológicas.

(b) Puesto que la $\Delta G'^{\circ}$ para la reacción de la PKF-1 es de −14,2 kJ/mol, calcule la constante de equilibrio para esta reacción.

(c) Compárense los valores de Q y K'_{eq}. ¿Está la reacción fisiológica cerca o lejos del equilibrio? Explíquelo. ¿Qué es lo que sugiere este experimento acerca del papel de la PKF–1 como enzima regulador?

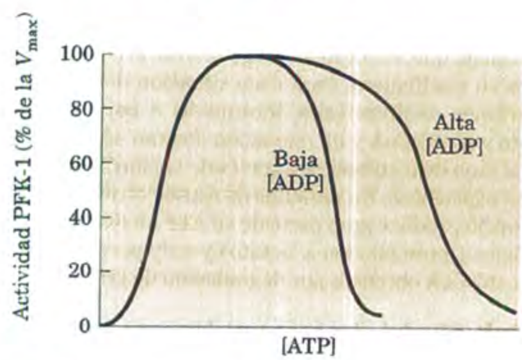
2. ¿Se encuentran todas las reacciones metabólicas en equilibrio?

(a) El fosfoenolpiruvato (PEP) es uno de los dos dadores de grupos fosforilo en la síntesis de ATP durante la glucólisis. En los eritrocitos humanos, la concentración del ATP en estado estacionario es 2,24 mM, siendo la del ADP de 0,25 mM y la del piruvato de 0,051 mM. Calcule la concentración de PEP a 25 °C suponiendo que la reacción de la piruvato quinasa (véase la Fig. 13–13) está en equilibrio en la célula.

(b) La concentración fisiológica de PEP en los eritrocitos humanos es de 0,023 mM. Compárese ésta con el valor obtenido en (a). Explique el significado de esta diferencia.

3. Efecto del suministro de O_2 sobre las tasas glucolíticas Los pasos regulados de la glucólisis en células intactas se pueden identificar mediante el estudio del catabolismo de la glucosa en tejidos completos u órganos. Por ejemplo, el consumo de glucosa por el músculo cardíaco puede medirse mediante circulación sanguínea artificial a través de un corazón aislado e intacto. Para ello se mide la glucosa en sangre antes y después de su paso por el corazón. Si la sangre circulante está desoxigenada, el músculo cardíaco consumirá glucosa a una velocidad constante. Cuando se añade oxígeno a la sangre, se produce una importante caída del consumo de glucosa y se mantiene a esa nueva velocidad reducida. ¿Por qué?

4. Regulación de la PFK-1 El efecto del ATP sobre el enzima alostérico PKF-1 se muestra a continuación. Para una concentración determinada de fructosa 6-fosfato, la actividad de la PKF-1 aumenta a medida que aumenta la concentración de ATP, pero se alcanza un punto más allá del cual el aumento de la concentración de ATP inhibe el enzima.



(a) Explique cómo puede el ATP jugar el doble papel de sustrato e inhibidor de la PFK-1. ¿Cómo se regula el enzima por el ATP?

(b) ¿Cómo se regula la glucólisis por la concentración de ATP?

(c) Explique por qué la inhibición de la PFK-1 por el ATP disminuye cuando la concentración de ADP es alta tal como se muestra en el gráfico.

5. Concentración celular de glucosa La concentración de glucosa en el plasma sanguíneo humano se mantiene alrededor de 5 mM. La concentración de glucosa libre en el interior de un miocito es muy inferior. ¿Por qué es tan baja la concentración en la célula? ¿Qué le pasa a la glucosa después de entrar en la célula? La glucosa se administra intravenosamente como fuente de alimento en algunos casos clínicos. Dado que la transformación de glucosa en glucosa 6-fosfato consume ATP, ¿por qué no se administra glucosa 6-fosfato por vía intravenosa?

6. Actividad enzimática y función fisiológica La V_{max} del enzima glucógeno fosforilasa de músculo esquelético es mucho mayor que la V_{max} del mismo enzima de tejido hepático.

(a) ¿Cuál es la función fisiológica de la glucógeno fosforilasa en el músculo esquelético? ¿Y en el tejido hepático?

(b) ¿Por qué la V_{max} del enzima muscular ha de ser mayor que la del enzima hepático?

7. Equilibrio de la glucógeno fosforilasa La glucógeno fosforilasa cataliza la eliminación de glucosa a partir del glucógeno. La $\Delta G'^{\circ}$ para esta reacción es 3,1 kJ/mol.

(a) Calcule la proporción de [P_i] a [glucosa 1-fosfato] cuando la reacción se halla en el equilibrio. (Pista: la eliminación de unidades de glucosa a partir del glucógeno no cambia la concentración de este último.)

(b) La proporción de [P_i] a [glucosa 1-fosfato] determinada en miocitos en condiciones fisiológicas es superior a 100:1. ¿Qué nos indica esto respecto a la dirección del flujo de metabolitos a través de la reacción de la glucógeno fosforilasa en el músculo?

(c) ¿Por qué son tan diferentes las proporciones de equilibrio y las fisiológicas? ¿Cuál es el posible significado de dicha diferencia?

8. Regulación de la glucógeno fosforilasa En el tejido muscular, la velocidad de conversión de glucógeno a glucosa 6-fosfato viene determinada por el cociente entre fosforilasa *a* (activa) y fosforilasa *b* (menos activa). ¿Qué le ocurre a la velocidad de degradación del glucógeno si una preparación de músculo que contiene glucógeno fosforilasa se trata con (a) fosforilasa quinasa y ATP; (b) PP1; (c) adrenalina?

9. Degradación del glucógeno en el músculo de conejo La utilización intracelular de la glucosa y del glucógeno está fuertemente regulada en cuatro puntos. Con el fin de comparar la regulación de la glucólisis cuando hay abundancia de oxígeno y cuando está ausente, considere la utilización de la glucosa y del glucógeno por el músculo de la pata de conejo en dos situaciones fisiológicas: un conejo en reposo, con baja demanda de ATP, y un conejo que avista su enemigo mortal, el coyote, y que corre hacia su madriguera. Para cada situación determine las concentraciones relativas (alta, intermedia o baja) de AMP, ATP, citrato y acetil-CoA y de qué modo afectan estas concentraciones al flujo de metabolitos a través de la glucólisis al regular enzimas específicos. En períodos de estrés, el músculo de la pata del conejo produce gran parte de su ATP mediante glucólisis anaeróbica (fermentación a lactato) y muy poca por oxidación del acetil-CoA obtenido por degradación de grasas.

10. Degradación del glucógeno en las aves migratorias A diferencia del conejo con sus carreras cortas, las aves migratorias requieren energía durante largos períodos de tiempo. Por ejemplo, los patos vuelan generalmente varios miles de quilómetros durante su migración anual. Los músculos de vuelo de las aves migratorias tienen una gran capacidad oxidativa y obtienen el ATP necesario mediante la oxidación del acetil-CoA (obtenido de las grasas) vía ciclo del ácido cítrico. Compare la regulación de la glucólisis muscular durante la actividad intensa pero corta, como en el caso del conejo que huye, con la que tiene lugar durante una actividad prolongada, como sucede con las aves migratorias. ¿Por qué ha de ser diferente la regulación en estas dos situaciones?

11. Defectos enzimáticos en el metabolismo glucídico A continuación se presentan los resúmenes de cuatro casos clínicos. Para cada caso determine cuál es el enzima defectuoso y elija el tratamiento adecuado a partir de la lista adjunta. Justifique sus elecciones. Conteste las preguntas formuladas en cada caso. (Puede que necesite referirse a la información contenida en el Capítulo 14.)

Caso A El paciente presenta vómitos y diarrea poco después de la ingestión de leche. Se le hace una prueba de tolerancia a la lactosa. (El paciente ingiere una cantidad estándar de lactosa midiéndose a intervalos la concentración de glucosa y galactosa en el plasma sanguíneo. En los individuos con un metabolismo glucídico normal los valores aumentan hasta un máximo en aproximadamente 1 h para disminuir seguidamente.) La concentración sanguínea de glucosa y de galactosa en el paciente no aumenta durante la prueba. ¿Por qué la glucosa y galactosa sanguíneas aumentan y luego disminuyen durante la prueba en los individuos normales?¿Por qué no aumentan en el caso del paciente?

Caso B El paciente presenta vómitos y diarrea tras la ingesta de leche. Se observa que su sangre tiene una concentración baja de glucosa pero una concentración muy superior a la normal de azúcares reductores. La orina da una prueba positiva para la galactosa. ¿Por qué es alta la concentración de azúcares reductores en la sangre? ¿Por qué aparece galactosa en la orina?

Caso C El paciente se queja de rampas musculares dolorosas cuando realiza ejercicio físico vigoroso pero no presenta más síntomas. Una biopsia muscular indica una concentración de glucógeno muscular muy superior a la normal. ¿Por qué se acumula el glucógeno?

Caso D El paciente es letárgico, su hígado está hipertrofiado y una biopsia del mismo muestra grandes cantidades de glucógeno. También tiene un nivel de glucosa sanguínea inferior al normal. Explique el motivo de la baja concentración de glucosa sanguínea en este paciente.

Enzima defectuoso
(a) PFK-1 muscular
(b) Fosfomanosa isomerasa
(c) Galactosa 1-fosfato uridililtransferasa
(d) Glucógeno fosforilasa hepática
(e) Triosa quinasa
(f) Lactasa de la mucosa intestinal
(g) Maltasa de la mucosa intestinal
(h) Enzima desramificante muscular

Tratamiento
1. Jogging de 5 km cada día
2. Dieta sin grasas
3. Dieta baja en lactosa
4. Evitar el ejercicio vigoroso
5. Grandes dosis de niacina (ácido nicotínico, precursor del NAD^+)
6. Comidas frecuentes (pequeñas porciones) de una dieta normal

12. Efectos de insuficiencia de insulina en una persona con diabetes Un hombre con diabetes insulinodependiente llega a urgencias en estado casi comatoso. Mientras pasaba las vacaciones perdió su medicación de insulina y no había recibido insulina durante dos días.

(a) Para cada uno de los tejidos señalados a continuación, ¿es cada ruta más rápida, más lenta o no varía en este paciente, en comparación con el nivel normal cuando recibe las cantidades adecuadas de insulina?

(b) Describa para cada ruta al menos un mecanismo de control responsable del cambio que haya predicho.

Tejidos y rutas
1. Adiposo: síntesis de ácidos grasos
2. Músculo: glucólisis, síntesis de ácidos grasos; síntesis de glucógeno
3. Hígado: gluconeogénesis; síntesis de glucógeno; síntesis de ácidos grasos; ruta de las pentosas fosfato

13. Metabolitos de la sangre en la insuficiencia de insulina Para el paciente descrito en el Problema 12, prediga los niveles en sangre de los siguientes metabolitos *antes* del tratamiento en urgencias, en relación con las concentraciones mantenidas durante el tratamiento adecuado con insulina: (a) glucosa; (b) cuerpos cetónicos; (c) ácidos grasos libres.

14. Efectos metabólicos de enzimas mutantes Prediga y explique el efecto sobre el metabolismo del glucógeno de cada uno de los siguientes defectos debidos a mutaciones: (a) pérdida del sitio de unión de cAMP en la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA); (b) pérdida del inhibidor de la proteína fosfatasa (inhibidor 1 de la Fig. 15–40); (c) sobreexpresión de fosforilasa *b* quinasa en el hígado; (d) receptores de glucagón defectuosos en el hígado.

15. Control hormonal del combustible metabólico Entre la cena y el desayuno su glucosa sanguínea desciende y su hígado se transforma en un productor neto y no un consumidor de glucosa. Describa la base hormonal de este cambio y explique

de qué modo el cambio hormonal desencadena la producción de glucosa por el hígado.

16. Metabolismo alterado en ratones manipulados genéticamente Se pueden manipular los genes de un ratón de modo que un gen en un tejido puede producir una proteína inactiva (un ratón "genosuprimido") o una proteína que es siempre (constitutivamente) activa. ¿Qué efectos puede predecir sobre el metabolismo con los siguientes cambios genéticos: (a) genosuprimido del enzima desramificador del glucógeno en el hígado; (b) genosuprimido de la hexoquinasa IV del hígado; (c) genosuprimido de la FBPasa-2 del hígado; (d) constitutivamente activo de la FBPasa-2 del hígado; (e) constitutivamente activo de la AMPK del músculo; (f) constitutivamente activo de la ChREBP del hígado?

Problema de análisis de datos

17. Estructura óptima del glucógeno Las células musculares necesitan un acceso rápido a grandes cantidades de glucosa durante el ejercicio intenso. Esta glucosa se almacena en el hígado y en el músculo esquelético en forma polimérica como partículas de glucógeno. Una partícula de glucógeno típica contiene unos 55.000 residùos de glucosa (véase la Fig. 15–33b). Meléndez-Hevia, Wadell y Shelton (1993) exploraron algunos aspectos teóricos de la estructura el glucógeno, tal como se describen en este problema.

(a) La concentración celular de glucógeno en el hígado es aproximadamente 0,01 μM. ¿Qué concentración de glucosa libre sería necesaria para almacenar una cantidad equivalente de glucosa? ¿Por qué esta concentración de glucosa libre presentaría un problema a la célula?

La glucosa se libera a partir del glucógeno gracias a la glucógeno fosforilasa, un enzima que puede eliminar moléculas de glucosa, una en cada paso, desde el extremo de una cadena de glucógeno. Las cadenas de glucógenos están ramificadas (véanse las Figs. 15–26 y 15–33b) y en ellas el grado de ramificación, el número de ramas por cadena, tiene una poderosa influencia sobre la velocidad a la que la glucógeno fosforilasa puede liberar glucosa.

(b) ¿Por qué un grado de ramificación demasiado bajo (es decir, por debajo del nivel óptimo) reduciría la velocidad de liberación de glucosa? (Pista: Considere el caso extremo de que no hubiesen ramificaciones en una cadena de 55.000 residuos de glucosa.)

(c) ¿Por qué un grado de ramificación que fuese demasiado elevado reduciría la velocidad de liberación de glucosa? (Pista: Piense en los impedimentos físicos.)

Meléndez-Hevia y colaboradores realizaron diversos cálculos y encontraron que sería óptimo dos ramas por cadena (véase la Fig. 15–33b) para los impedimentos físicos descritos anteriormente. Esto es lo que se encuentra en el glucógeno almacenado en músculo e hígado.

Para determinar el número óptimo de residuos de glucosa por cadena, Meléndez-Hevia y colaboradores consideraron dos parámetros clave que definen la estructura de una partícula de glucógeno: t = número de niveles de cadenas de glucosa en una partícula (la molécula de la Fig. 15–33b tiene cinco niveles); g_c = número de residuos de glucosa por cadena. Se propusieron encontrar los valores de t y g_c que maximizarían tres cantidades: (1) la cantidad de glucosa almacenada en la partícula (G_T) por unidad de volumen; (2) el número de cadenas de glucosa no ramificadas (C_A) por unidad de volumen (es decir, el número de cadenas en el nivel más exterior, fácilmente accesibles a la glucógeno fosforilasa), y (3) la cantidad de glucosa disponible para la fosforilasa en estas cadenas sin ramificar (G_{PT}).

(d) Demuestre que $C_A = 2^{t-1}$. Éste es el número de cadenas asequibles a la glucógeno fosforilasa antes de la acción del enzima desramificante.

(e) Demuestre que C_T, el número total de cadenas en la partícula, viene dado por $C_T = 2^t - 1$. Así $G_T = g_c(C_T) = g_c(2^t - 1)$, número total de residuos de glucosa en la partícula.

(f) La glucógeno fosforilasa no puede eliminar residuos de glucosa de las cadenas de glucógeno que tienen menos de cinco residuos. Demuestre que $G_{PT} = (g_c - 4)(2^{t-1})$. Ésta es la cantidad de glucosa fácilmente asequible a la glucógeno fosforilasa.

(g) En función del tamaño del residuo de glucosa y la localización de las ramificaciones, el grosor de un nivel de glucógeno es $0,12g_c$ nm + 0,35 nm. Demuestre que el volumen de una partícula, V_s, viene dado por la ecuación $V_s = \frac{4}{3}\pi t^3(0,12g_c + 0,35)^3\ \text{nm}^3$.

Meléndez-Hevia y coautores determinaron seguidamente los valores óptimos de t y g_c, los que daban lugar a un valor máximo de una función de calidad, f, que maximiza G_T, C_A y G_{PT}, mientras que se minimiza V_s: $f = \frac{G_T C_A G_{PT}}{V_s}$. Encontraron que el valor óptimo de g_c es independiente de t.

(h) Escoja un valor de t entre 5 y 15 y encuentre el valor óptimo de g_c. ¿Qué relación tiene este valor con el de g_c encontrado con el glucógeno hepático (véase la Fig. 15–33b)? (Pista: Puede que le sea útil un programa "spreadsheet")

Referencia

Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., & Shelton, E.D. (1993) Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* **295**, 477–483.

16

> Si se añade citrato, la tasa respiratoria aumenta a menudo . . . la captación extra de oxígeno es, con mucho, mayor de lo que se explicaría por la oxidación completa del citrato . . . Dado que el ácido cítrico actúa de manera catalítica en el tejido, es probable que sea eliminado por una reacción primaria pero sea regenerado por una reacción posterior.
>
> —*H. A. Krebs y W. A. Johnson, artículo en* Enzymologia, *1937*

El ciclo del ácido cítrico

En el Capítulo 14 vimos que algunas células obtienen energía (ATP) a partir de la fermentación, degradando glucosa en ausencia de oxígeno. Para la mayor parte de células eucarióticas y un gran número de bacterias que viven en condiciones aeróbicas y oxidan sus combustibles orgánicos a dióxido de carbono y agua, la glucólisis no es sino la primera etapa de la oxidación completa de la glucosa. El piruvato formado en la glucólisis en vez de ser reducido a lactato, etanol o algún otro producto de fermentación, sufre una oxidación mayor hasta H_2O y CO_2. Esta fase aeróbica del catabolismo se denomina **respiración.** En el sentido fisiológico más amplio o macroscópico, la respiración se refiere a la captación de O_2 por un organismo multicelular y la consiguiente liberación de CO_2. Sin embargo, los bioquímicos y los biólogos celulares utilizan este término en un sentido más estricto para referirse a los procesos moleculares mediante los cuales *las células* consumen O_2 y producen CO_2, procesos conocidos más precisamente como **respiración celular.**

La respiración celular tiene lugar en tres fases principales (**Fig. 16–1**). En la primera, las moléculas de combustible orgánico (glucosa, ácidos grasos y algunos aminoácidos) se oxidan para dar lugar a fragmentos de dos átomos de carbono en forma del grupo acetilo del acetil-coenzima A (acetil-CoA). En la segunda fase, los grupos acetilo se incorporan al ciclo del ácido cítrico, donde son oxidados enzimáticamente hasta CO_2. La energía liberada en esta oxidación se conserva en los transportadores de electrones reducidos NADH y $FADH_2$. En la tercera fase de la respiración, estos coenzimas reducidos son a su vez oxidados, liberando protones (H^+) y electrones. Los electrones son transferidos a lo largo de una cadena de moléculas transportadoras (conocida como cadena respiratoria) al O_2, el aceptor electrónico final. Durante este proceso de transferencia electrónica se libera una gran cantidad de energía, que se conserva en forma de ATP gracias al proceso denominado fosforilación oxidativa (Capítulo 19). La respiración es más compleja que la glucólisis y se cree que apareció mucho más tarde, después de la aparición de las cianobacterias. La actividad metabólica de las cianobacterias es la responsable del enriquecimiento en oxígeno de la atmósfera terrestre, punto de inflexión determinante en el proceso de la evolución.

Consideraremos en primer lugar la conversión del piruvato en grupos acetilo, seguido por la entrada de estos grupos en el **ciclo del ácido cítrico,** llamado también **ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA)** o **ciclo de Krebs** (por su descubridor, Hans Krebs). Repasaremos a continuación las reacciones del ciclo y los enzimas que las catalizan. Puesto que intermediarios del ciclo del ácido cítrico son utilizados como precursores biosintéticos, consideraremos algunas vías en las cuales se reponen estos intermediarios. El ciclo del acido cítrico es un punto clave del metabolismo, que comprende importantes pasos degradativos y anabólicos, y está finamente regulado en coordinación con otras rutas. El capítulo termina con una descripción de la ruta del glioxilato, secuencia metabólica de algunos organismos que utilizan varios enzimas y reacciones del ciclo del ácido cítrico para dar lugar a la síntesis neta de glucosa a partir de triacilgliceroles de reserva.

Hans Krebs, 1900–1981

Importante para integración

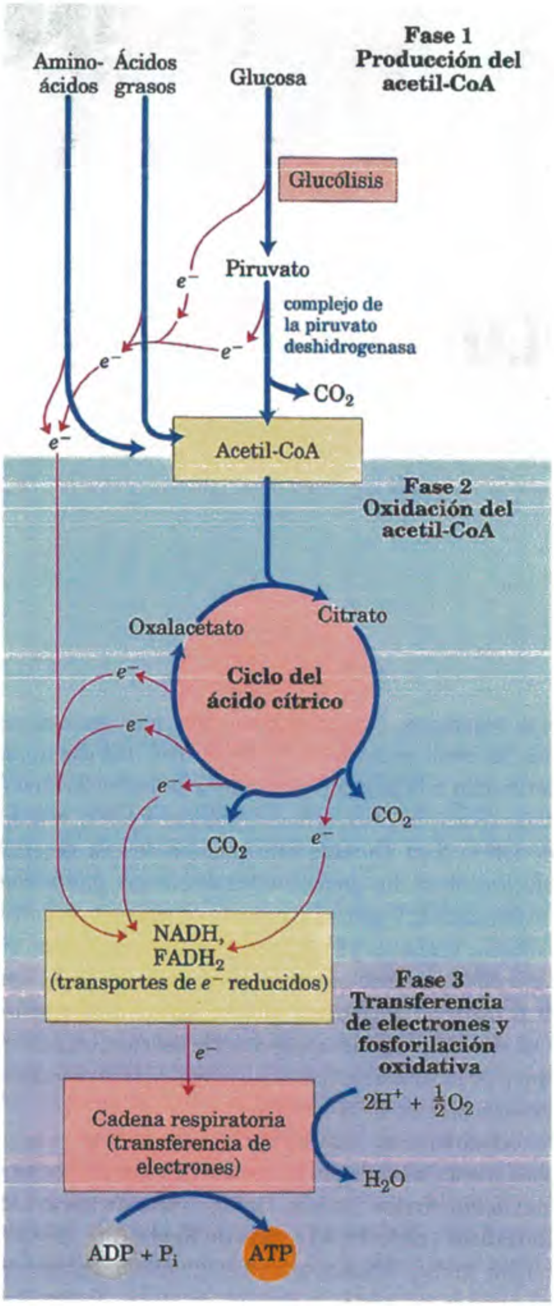


FIGURA 16–1 Catabolismo de proteínas, grasas y glúcidos en las tres etapas de la respiración celular. Etapa 1: la oxidación de los ácidos grasos, glucosa y algunos aminoácidos da acetil-CoA. Etapa 2: la oxidación de los grupos acetilo en el ciclo del ácido cítrico incluye cuatro pasos en los que se sustraen electrones. Etapa 3: los electrones transportados por el NADH y el $FADH_2$ llegan a una cadena de transportadores electrónicos mitocondriales (o bien transportadores unidos a la membrana plasmática en el caso de las bacterias) —la cadena respiratoria— con reducción final del O_2 a H_2O. Este flujo electrónico impulsa la producción de ATP.

16.1 Producción de acetil-CoA (acetato activado)

En los organismos aeróbicos, la glucosa y otros azúcares, los ácidos grasos y la mayor parte de los aminoácidos se oxidan finalmente a CO_2 y H_2O a través del ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria. Antes de entrar en el ciclo del ácido cítrico, los esqueletos carbonados de azúcares y ácidos grasos deben ser degradados al grupo acetilo del acetil-CoA, la forma en que el ciclo del ácido cítrico acepta la mayor parte del combustible aportado. Muchos de los carbonos de los aminoácidos también entran en el ciclo de esta forma, aunque las vías de degradación de algunos aminoácidos dan lugar a otros intermediarios del ciclo. En este apartado consideraremos de qué modo el piruvato, procedente de la glucosa y otros azúcares a través de la glucólisis, se oxida para dar lugar a acetil-CoA y CO_2 a consecuencia de la acción que sobre él ejerce una agrupación estructurada de tres enzimas con múltiples copias de cada uno de ellos, el **complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH),** localizado en las mitocondrias de las células eucarióticas y en el citosol de las bacterias.

El estudio a fondo de este complejo enzimático puede resultar interesante por diversas razones. El complejo de la PDH es un ejemplo clásico y bien estudiado de complejo multienzimático en el que una serie de intermedios químicos permanecen unidos a la superficie de las moléculas enzimáticas mientras se produce la transformación del sustrato en el producto final. En el mecanismo de reacción participan cinco cofactores, cuatro de ellos derivados de vitaminas. La regulación de este complejo enzimático ilustra también de qué manera una combinación de modificaciones covalentes y regulación alostérica permite obtener un control preciso del flujo a través de un paso metabólico. Finalmente, el complejo de la PDH es el prototipo de otros dos importantes complejos enzimáticos: la α-cetoglutarato deshidrogenasa del ciclo del ácido cítrico y la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa de las rutas oxidativas de diversos aminoácidos (véase la Fig. 18-28). La extraordinaria similitud en su estructura proteica, los cofactores empleados y los mecanismos de reacción de estos tres complejos son sin duda un reflejo de un origen evolutivo común.

El piruvato se oxida a acetil-CoA y CO_2

La reacción global catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa es una **descarboxilación oxidativa,** un proceso de oxidación irreversible en el que el piruvato pierde un grupo carboxilo en forma de molécula de CO_2 y los dos carbonos restantes se transforman en el grupo acetilo del acetil-CoA **(Fig. 16–2)**. El NADH formado en esta reacción libera un ión hidruro (:H^-) a la cadena respiratoria (Fig. 16–1), que trans-

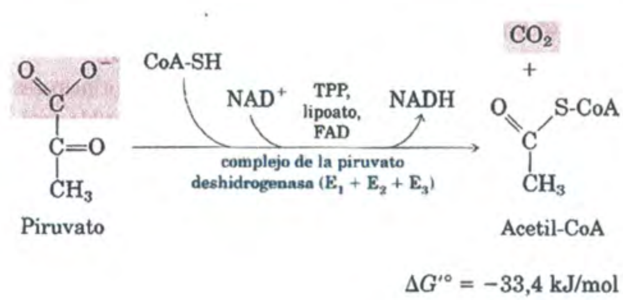


FIGURA 16–2 Reacción global catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa. Los cinco coenzimas que participan en esta reacción, así como los tres enzimas que forman el complejo enzimático, se discuten en el texto.

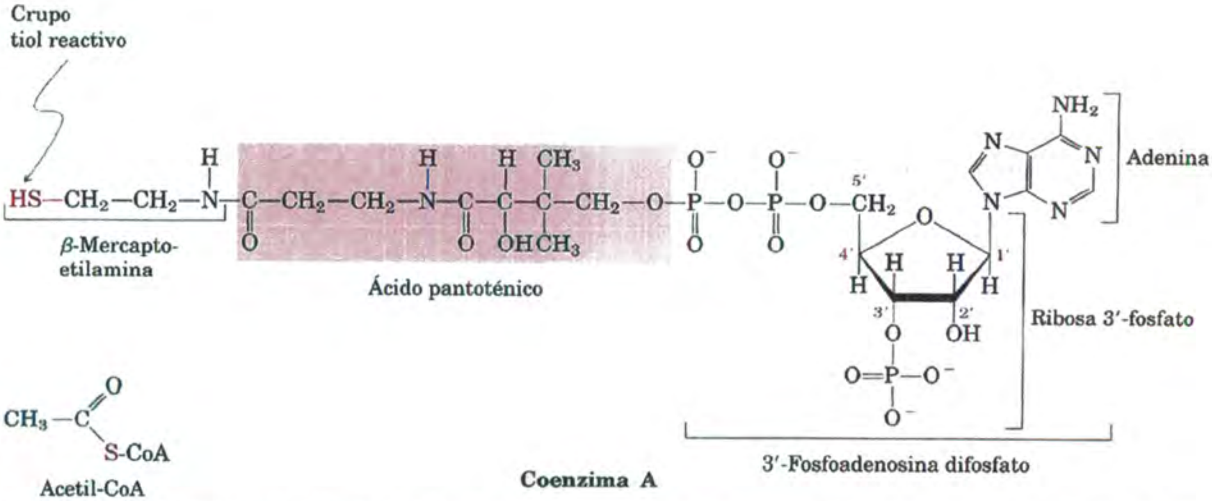


FIGURA 16–3 Coenzima A (CoA). Un grupo hidroxilo del ácido pantoténico se une a una porción de ADP modificado a través de un enlace éster fosfato, y su grupo carboxilo se une mediante un enlace amida a la β-mercaptoetilamina. El grupo hidroxilo en la posición 3' de la porción ADP tiene un grupo fosforilo que no está presente en el ADP libre. El grupo —SH de la porción mercaptoetilamina forma un tioéster con el acetato en el acetil-coenzima A (acetil-CoA) (parte inferior izquierda).

porta los dos electrones hasta el oxígeno o, en los microorganismos anaeróbicos, hasta un aceptor de electrones alternativo tal como el nitrato o el sulfato. La transferencia de electrones desde el NADH hasta el oxígeno genera en última instancia 2,5 moléculas de ATP por cada par de electrones. Se ha demostrado la irreversibilidad de la reacción del complejo de la PDH mediante experimentos con isótopos radiactivos: el complejo no puede unir de nuevo CO_2 marcado radiactivamente al acetil-CoA para generar piruvato marcado en el grupo carboxilo.

El complejo de la piruvato deshidrogenasa necesita cinco coenzimas

La deshidrogenación y descarboxilación combinadas del piruvato para formar el grupo acetilo del acetil-CoA (Fig. 16–2) requiere la acción secuencial de tres enzimas diferentes, así como de cinco coenzimas o grupos prostéticos diferentes: tiamina pirofosfato (TPP), flavina adenina dinucleótido (FAD), coenzima A (CoA, a veces mostrado como CoA-SH para poner de relieve el papel del grupo —SH), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y lipoato. Cuatro vitaminas diferentes, esenciales en la nutrición humana, son componentes vitales de este sistema: la tiamina (en el TPP), la riboflavina (en el FAD), la nicotinamida (en el NAD) y el pantotenato (en el CoA). Ya hemos descrito los papeles del FAD y el NAD como transportadores de electrones (Capítulo 13), y hemos encontrado el TPP como coenzima de la piruvato descarboxilasa (véase la Fig. 14–14).

El coenzima A **(Fig. 16–3)** contiene un grupo tiol reactivo (—SH), de importancia fundamental dentro de su papel como transportador de grupos acilo en diversas reacciones metabólicas. Los grupos acilo se unen covalentemente al grupo tiol, formando **tioésteres.** A consecuencia de su relativamente elevada energía libre de hidrólisis (véanse las Figs. 13–16, 13–17), los tioésteres tienen un elevado potencial de transferencia de grupos acilo que les permite ceder estos grupos a diversas moléculas aceptoras. De este modo, puede considerarse que el grupo acilo unido al coenzima A, está "activado" para la transferencia de grupo.

El quinto cofactor del complejo de la PDH, el **lipoato (Fig. 16–4)**, tiene dos grupos tiol que pueden experimentar una oxidación reversible hasta formar un enlace disulfuro (—S—S—), similar al que se produce entre dos residuos Cys en proteínas. Gracias a esta capacidad de experimentar reacciones de oxidación-reducción, el lipoato puede actuar a la vez como transportador de electrones (hidrógeno) y de acilos, tal como veremos a continuación.

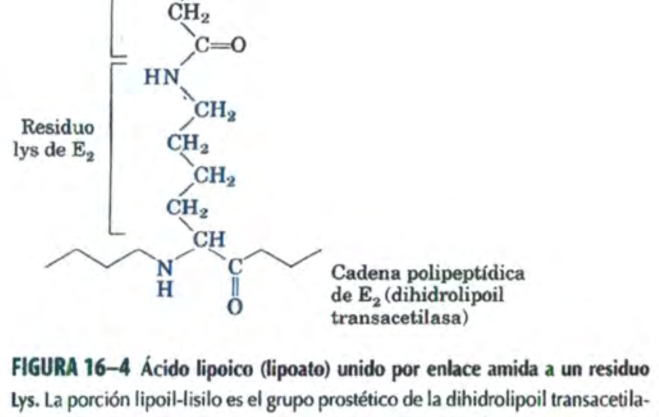


FIGURA 16–4 Ácido lipoico (lipoato) unido por enlace amida a un residuo Lys. La porción lipoil-lisilo es el grupo prostético de la dihidrolipoil transacetilasa (E_2 del complejo de la PDH). El grupo lipoilo puede hallarse oxidado (disulfuro) o bien reducido (ditiol) y actúa como un transportador de hidrógeno y de un grupo acetilo (u otro acilo).

El complejo de la piruvato deshidrogenasa está formado por tres enzimas diferentes

El complejo de la PDH está formado por copias múltiples de los tres enzimas: **piruvato deshidrogenasa** (E_1), **dihidrolipoil transacetilasa** (E_2) y **dihidrolipoil deshidrogenasa** (E_3). El número de copias de cada enzima, y por tanto el tamaño del complejo, varía de un organismo a otro. El complejo de la PDH aislado a partir de mamíferos tiene un diámetro de aproximadamente 50 nm, más de cinco veces el tamaño de un ribosoma y suficientemente grande para visualizarse a través del microscopio electrónico **(Fig. 16–5a)**. En el enzima bovino hay 60 copias idénticas de E_2 que forman un dodecaedro pentagonal (el núcleo) con un diámetro de unos 25 nm (Fig. 16–5b). (El núcleo del enzima de *Escherichia coli*, contiene 24 copias de E_2.) E_2 es el punto de conexión del grupo prostético lipoato, unido a través de un enlace amida al grupo ε-amino de un residuo Lys (Fig. 16–4). E_2 tiene tres dominios funcionalmente distintos (Fig. 16–5c): el *dominio lipoilo* amino-terminal, que contiene el residuo(s) lipoil-Lys; el *dominio de unión* a E_1 y E_3 central, y el *dominio aciltransferasa* del núcleo interior, que contiene el sitio activo de la acetiltransferasa. El complejo PDH de levadura tiene un único dominio lipoilo con un lipoato unido, pero el complejo de mamíferos tiene dos y el de *E. coli* tiene tres (Fig. 16–5c). Los dominios de E_2 están separados por conectores, secuencias de 20 a 30 residuos aminoácidos, ricas en Ala y Pro y entremezcladas con residuos cargados; estos conectores tienden a adoptar sus formas extendidas, con lo que mantienen separados los tres dominios.

El sitio activo de E_1 contiene TPP unido y el de E_3 contiene FAD unido. Existen además dos proteínas reguladoras, una proteína quinasa y una fosfoproteína fosfatasa, que también for-

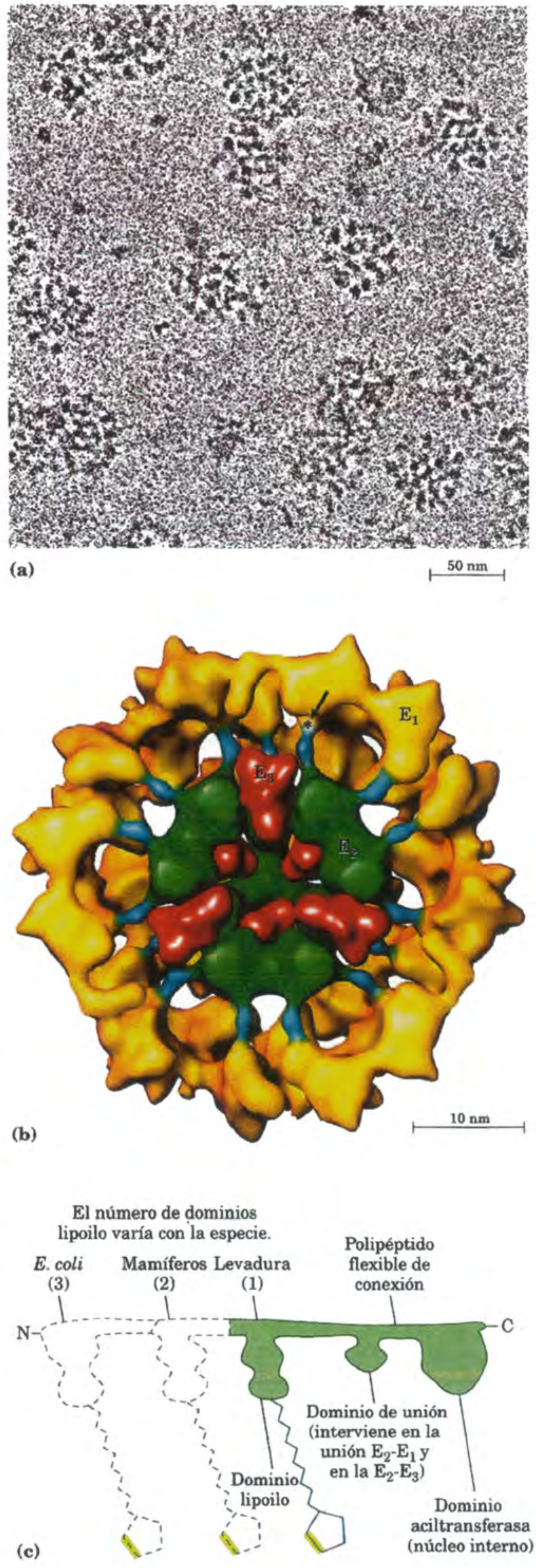


FIGURA 16–5 Estructura del complejo de la piruvato deshidrogenasa. (a) Micrografía crioelectrónica de complejos de la PDH aislados de riñón bovino. En la microscopia crioelectrónica se observan muestras biológicas a temperaturas extremadamente bajas; esto impide la aparición de artefactos potenciales introducidos por el proceso usual de deshidratación, fijación y tinción. **(b)** Imagen tridimensional del complejo de la PDH que muestra la estructura de subunidades: E_1, piruvato deshidrogenasa; E_2, dihidrolipoil transacetilasa, y E_3, dihidrolipoil deshidrogenasa. Esta imagen se ha reconstruido mediante análisis de un gran número de imágenes tales como las que aparecen en **(a)**, en combinación con estudios cristalográficos de las subunidades individuales. El núcleo (verde) consta de 60 moléculas de E_2, ordenadas en 20 trímeros que forman un dodecaedro pentagonal. El dominio lipoilo de E_2 (azul) se proyecta hacia fuera para tocar los sitios activos de las moléculas de E_1 (amarillo) ordenadas sobre el núcleo de E_2. Varias subunidades de E_3 (rojo) también están unidas al núcleo, en donde el brazo basculante presente en E_2 puede alcanzar sus sitios activos. El sitio en donde un grupo lipoilo está unido al dominio lipoilo de E_2 está marcado con un asterisco. Para que la estructura sea más clara se han eliminado alrededor de la mitad del complejo perteneciente a la parte frontal. Este modelo fue preparado por Z.H. Zhou et al. (2001); en otro modelo propuesto por J.L.S. Milne et al. (2002), las subunidades E_3 están localizadas más hacia la periferia (véase la Bibliografía). **(c)** E_2 consta de tres tipos de dominios unidos por polipéptidos cortos de conexión: un dominio catalítico aciltransferasa; un dominio de unión, que interviene en la unión de E_2 a E_1 y E_3, y uno o más dominios lipoilo (según la especie).

man parte del complejo y que se describen posteriormente. Esta estructura básica E_1-E_2-E_3 se ha conservado durante la evolución y se utiliza en diversa reacciones metabólicas similares, entre las que se incluyen la oxidación del α-cetoglutarato en el ciclo del ácido cítrico (descrita más adelante) y la oxidación de los α-cetoácidos procedentes de la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada valina, isoleucina y leucina (véase la Fig. 18–28). Dentro de una especie dada, E_3 del complejo de la PDH es idéntico a E_3 de los otros dos complejos enzimáticos. La unión del lipoato al extremo de la cadena lateral de una Lys en E_2 da lugar a un brazo largo y flexible que puede desplazarse desde el sitio activo de E_1 a los sitios activos de E_2 y E_3, una distancia de unos 5 nm o más.

En la canalización de sustratos, los intermedios nunca abandonan la superficie enzimática

En la **Figura 16–6** se muestra esquemáticamente de qué modo el complejo de la piruvato deshidrogenasa lleva a cabo las cinco reacciones consecutivas en la descarboxilación y deshidrogenación del piruvato. El paso ① es en esencia idéntico a la reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa (véase la Fig. 14-14c); el C-1 del piruvato se elimina en forma de CO_2, y el C-2, que en el piruvato se encuentra en el estado de oxidación correspondiente a un aldehído, se une al TPP en forma de grupo hidroxietilo. Este primer paso es el más lento y, por tanto, limita la velocidad de la reacción global. Es también el punto en el que el complejo de la PDH ejerce su especificidad de sustrato. En el paso ②, el grupo hidroxietilo se oxida para dar lugar a un ácido carboxílico (acetato). Los dos electrones eliminados en esta reacción de oxidación reducen el —S—S— de un grupo lipoilo en E_2 para dar lugar a dos grupos tiol (—SH). La porción acetilo producida en esta reacción de oxidación-reducción se esterifica en primer lugar con uno de los grupos —SH del lipoilo, y a continuación se transesterifica con el CoA para dar acetil-CoA (paso ③). Así, la energía de oxidación impulsa la formación de un tioéster del acetato de elevada energía. El resto de las reacciones catalizadas por el complejo de la PDH (por E_3 en los pasos ④ y ⑤) son transferencias electrónicas necesarias para la regeneración de la forma oxidada (disulfuro) del grupo lipoilo de E_2, preparando así el complejo enzimático para otro ciclo oxidativo. Los electrones extraídos del grupo hidroxietilo procedente del piruvato pasan a través del FAD al NAD^+.

Los brazos basculantes lipoil-lisilo de E_2 desempeñan un papel central en el mecanismo del complejo de la PDH al aceptar de E_1 los dos electrones y el grupo acetilo procedentes del piruvato y pasarlos a E_3. Todos estos enzimas y coenzimas se encuentran agrupados, lo que permite a los intermedios reaccionar rápidamente sin difundir fuera de la superficie del complejo enzimático. La secuencia de cinco reacciones mostrada en la Figura 16–6 es, por tanto, un ejemplo de **canalización de sustratos.** Los intermedios de la secuencia de varios pasos nunca abandonan el complejo, con lo que la concentración local del sustrato de E_2 se mantiene siempre muy alta. La canalización también impide el robo del grupo acetilo activado por otros enzimas que utilizan este grupo como sustrato. Tal como veremos, un mecanismo de ligado similar para la canalización del sutrato entre sitios activos es utilizado en diversos enzimas en los que el lipoato, la biotina o una porción tipo CoA actúan como cofactores.

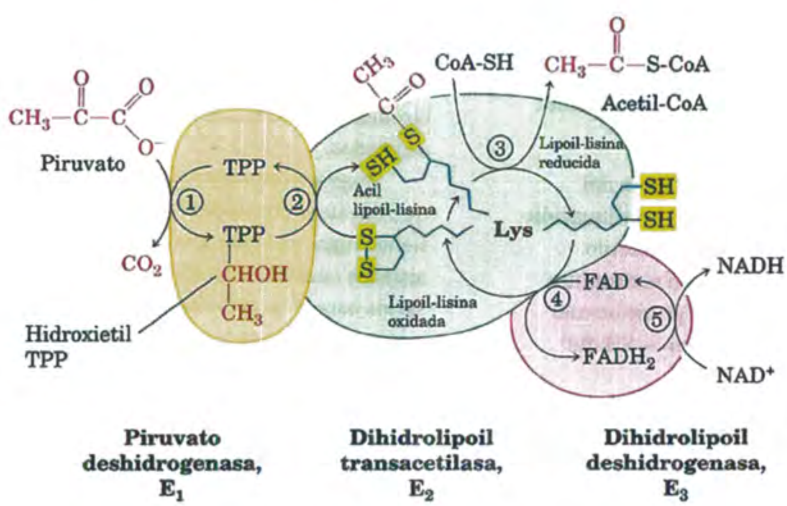


FIGURA 16–6 Descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA por el complejo de la PDH. El destino del piruvato se muestra en rojo. En el paso ①, el piruvato reacciona con el tiamina pirofosfato (TPP) unido a la piruvato deshidrogenasa (E_1), experimentando una descarboxilación hasta el derivado hidroxietilo (véase Fig. 14–14). La piruvato deshidrogenasa es también la responsable del paso ②. En él se transfieren dos electrones y el grupo acetilo desde el TPP hasta la forma oxidada del grupo lipoil-lisilo del enzima núcleo, la dihidrolipoil transacetilasa (E_2), formándose el acetil tioéster del grupo lipoilo reducido. El paso ③ es una transesterificación en la que el grupo —SH del CoA sustituye el grupo —SH de E_2 para obtener acetil-CoA y el grupo lipoilo en su forma completamente reducida (ditiol). En el paso ④, la dihidrolipoil deshidrogenasa (E_3) promueve la transferencia de dos átomos de hidrógeno de los grupos lipoilo reducidos de E_2 al grupo prostético FAD de E_3, restableciendo la forma oxidada del grupo lipoil-lisilo de E_2. En el paso ⑤, el $FADH_2$ reducido de E_3 transfiere un ión hidruro al NAD^+, formando NADH. El complejo enzimático está ya preparado para un nuevo ciclo catalítico. (Los colores de las subunidades se corresponden con los de la Fig. 16–5b.)

Como es de esperar, tanto las mutaciones en los genes de las subunidades del complejo de la PDH como la deficiencia de tiamina en la dieta pueden acarrear graves consecuencias. Los animales que presentan deficiencia de tiamina no son capaces de oxidar el piruvato con normalidad. Esto es especialmente importante para el cerebro, que obtiene normalmente toda su energía de la oxidación aeróbica de la glucosa, a través de una ruta que necesariamente incluye la oxidación del piruvato. El beriberi, una enfermedad causada por una carencia de tiamina, se caracteriza por la pérdida de función neuronal. Esta enfermedad incide sobre todo en poblaciones cuya alimentación depende básicamente del arroz blanco (pulido) que carece de las cáscaras en las que se encuentra la mayor parte de la tiamina del arroz. Las personas que consumen de forma habitual grandes cantidades de alcohol también pueden desarrollar una deficiencia de tiamina; la mayor parte de su dieta diaria, bebidas alcohólicas destiladas, son "calorías vacías" exentas de vitaminas. Un nivel elevado de piruvato en sangre suele indicar defectos en la oxidación del piruvato producidos por una de estas causas. ■

RESUMEN 16.1 Producción de acetil-CoA (acetato activado)

- El piruvato, producto de la glucólisis, se convierte en acetil-CoA, material de partida del ciclo del ácido cítrico, por acción del complejo de la piruvato deshidrogenasa.
- El complejo de la PDH está compuesto por múltiples copias de tres enzimas: piruvato deshidrogenasa, E_1 (con su cofactor ligado el TPP); dihidrolipoil transacetilasa, E_2 (con su grupo lipoilo unido de modo covalente) y dihidrolipoil deshidrogenasa, E_3 (con sus cofactores FAD y NAD).
- E_1 cataliza en primer lugar la descarboxilación del piruvato, produciendo hidroxietil-TPP y a continuación la oxidación del grupo hidroxietilo a grupo acetilo. Los electrones de esta oxidación reducen el disulfuro del lipoato unido a E_2, y se transfiere el grupo acetilo en forma de enlace tioéster con un grupo —SH del lipoato reducido.
- E_2 cataliza la transferencia del grupo acetilo al coenzima A formando acetil-CoA.
- E_3 cataliza la regeneración de la forma disulfuro (oxidada) del lipoato; los electrones pasan primero al FAD y a continuación al NAD^+.
- El largo brazo de lipoil-lisina bascula desde el sitio activo de E_1 al de E_2 y al de E_3, ligando los intermedios al complejo enzimático para permitir de este modo la canalización de los sustratos.
- La organización del complejo de la PDH es muy similar a la de los complejos enzimáticos que catalizan la oxidación del α-cetoglutarato y la de los α-cetoácidos de cadena ramificada.

16.2 Reacciones del ciclo del ácido cítrico

Podemos ahora seguir el proceso mediante el cual se oxida el acetil-CoA. Dicha transformación química se realiza en el ciclo del ácido cítrico, la primera vía metabólica *cíclica* que hemos encontrado (**Fig. 16–7**). Para iniciar una vuelta del ciclo el acetil-CoA cede su grupo acetilo al oxalacetato, un compuesto de cuatro átomos de carbono, formando una molécula de citrato de seis carbonos. El citrato se transforma entonces en isocitrato, otra molécula de seis carbonos, que al deshidrogenarse perdiendo CO_2 genera α-cetoglutarato, un compuesto de cinco átomos de carbono también llamado oxoglutarato. El α-cetoglutarato sufre la pérdida de una segunda molécula de CO_2, produciendo finalmente succinato de cuatro carbonos. A continuación el succinato se convierte mediante una secuencia de tres reacciones enzimáticas en el compuesto de cuatro carbonos oxalacetato, con lo que queda listo para reaccionar con otra molécula de acetil-CoA. En cada vuelta del ciclo se produce la entrada de un grupo acetilo (dos carbonos) en forma de acetil-CoA y la salida de dos moléculas de CO_2; se utiliza una molécula de oxalacetato para formar citrato y se regenera una molécula de oxalacetato. No se produce una pérdida neta de oxalacetato; en teoría, una sola molécula de este compuesto sería suficiente para promover la oxidación de un número infinito de grupos acetilo y de hecho el oxalacetato se encuentra en las células en concentraciones muy bajas. Cuatro de los ocho pasos de este proceso son oxidaciones en las que la energía de oxidación se conserva, con elevada eficiencia, en forma de los coenzimas reducidos NADH y $FADH_2$.

Tal como se dijo, a pesar del papel central que juega el ciclo del ácido cítrico en el metabolismo energético, su función no se limita a la conservación de la energía. Los intermediarios de cuatro y cinco átomos de carbono del ciclo actúan de precursores de una amplia gama de productos. Las células emplean las denominadas reacciones anapleróticas (de relleno), que describiremos más adelante, para reemplazar los intermediarios así desviados.

Eugene Kennedy y Albert Lehninger demostraron en 1948 que en eucariotas todas las reacciones del ciclo del ácido cítrico tienen lugar en la mitocondria. Observaron que las mitocondrias aisladas contienen no sólo todos los enzimas y coenzimas necesarios para el ciclo del ácido cítrico, sino también todos los enzimas y proteínas necesarios para que tenga lugar la última etapa de la respiración, es decir, la transferencia electrónica y la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa. Tal como veremos en capítulos posteriores, las mitocondrias también contienen los enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos y de algunos aminoácidos a acetil-CoA y la degradación oxidativa de otros aminoácidos a α-cetoglutarato, succinil-CoA u oxalacetato. Así, en eucariotas no fotosintéticos la mitocondria es el lugar donde se producen la mayor parte de reacciones oxidativas que liberan energía y la síntesis acoplada de ATP. En los eucariotas fotosintéticos la mayor parte del ATP producido en la oscuridad se genera en las mitocondrias, aunque los cloroplastos producen la mayor parte del ATP en condiciones de iluminación. En la mayoría de bacterias los enzimas del ciclo del ácido cítrico se localizan en el citosol, y su membrana plasmática tiene un papel análogo al desempeñado por la membrana mitocondrial interna en la síntesis de ATP (Capítulo 19).

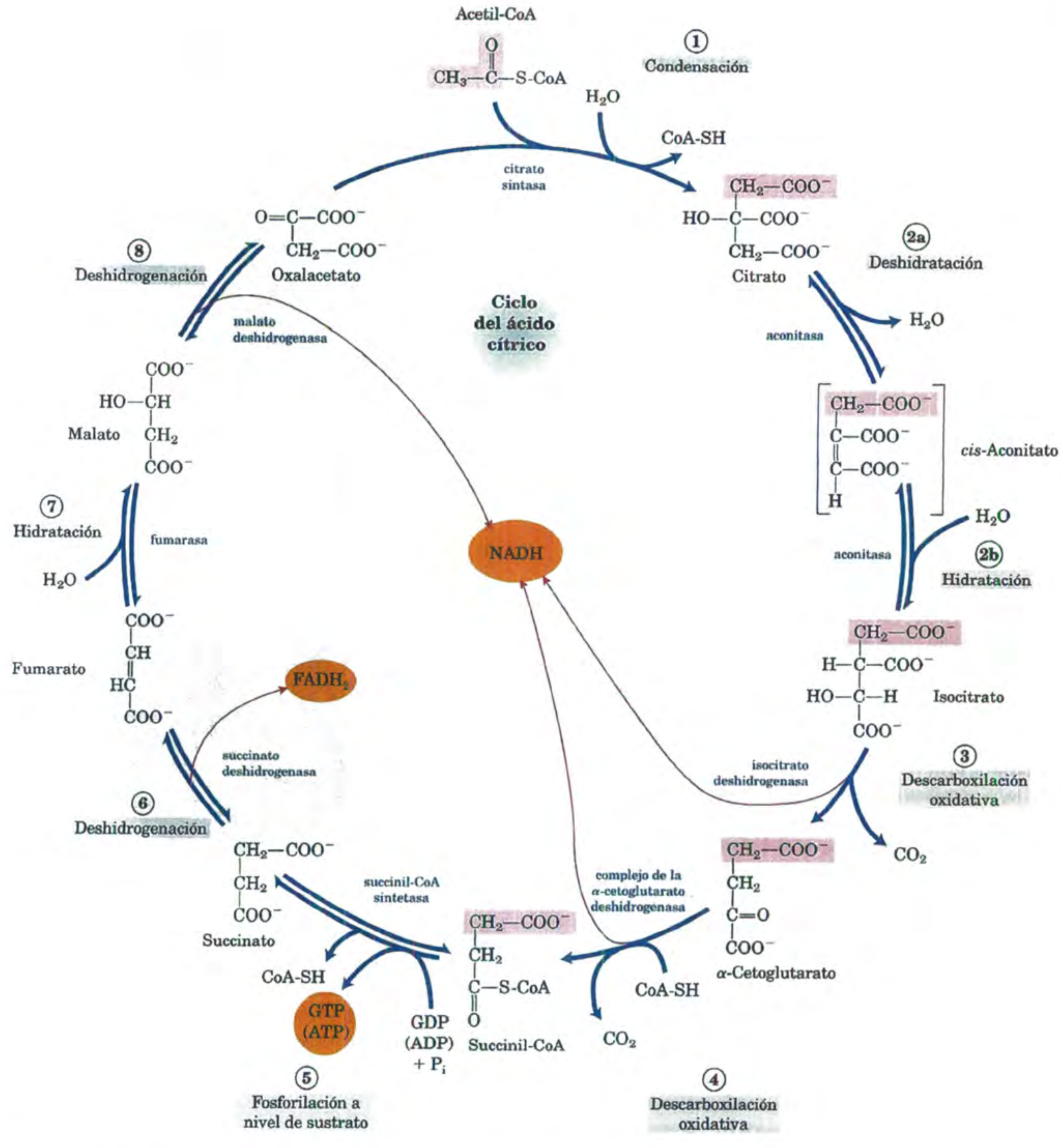
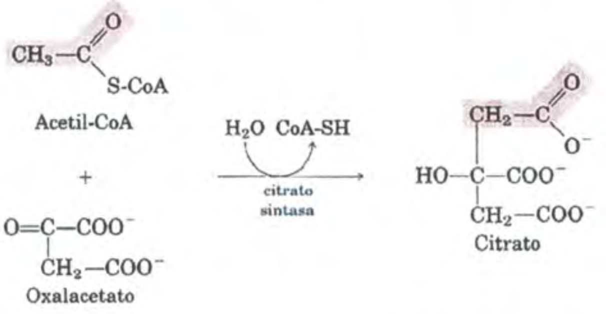


FIGURA 16–7 Reacciones del ciclo del ácido cítrico. Los átomos de carbono marcados en rosa son los correspondientes al acetato del acetil-CoA en la primera vuelta del ciclo; *no* son los carbonos liberados como CO_2 en la primera vuelta. Obsérvese que en el succinato y el fumarato el grupo de dos átomos de carbono procedente del acetato ya no se puede distinguir específicamente; debido a que el succinato y el fumarato son moléculas simétricas, C-1 y C-2 son indistinguibles de C-4 y C-3. El número que aparece indicando cada paso corresponde al título referido en el texto (páginas 622-628). Las flechas rojas marcan los lugares donde se conserva la energía por transferencia electrónica a FAD o NAD^+, formando $FADH_2$ y NADH + H^+. Los pasos ①, ③ y ④ son esencialmente irreversibles en la célula; todas las otras etapas son reversibles. El producto del paso ⑤ puede ser ATP o GTP, en función del isozima de la succinil-CoA sintetasa que actúa como catalizador.

El ciclo del ácido cítrico consta de ocho pasos

Al examinar los ocho pasos consecutivos del ciclo del ácido cítrico, pondremos especial énfasis en las transformaciones químicas que tienen lugar cuando el citrato producido a partir de acetil-CoA y oxalacetato es oxidado, dando lugar a la aparición de CO_2 al tiempo que la energía procedente de esta oxidación es almacenada en los coenzimas NADH y $FADH_2$ reducidos.

① **Formación de citrato** La primera reacción del ciclo es la condensación del acetil-CoA con **oxalacetato** para dar lugar a **citrato,** en una reacción catalizada por la **citrato sintasa:**



$\Delta G'^{\circ} = -32{,}2$ kJ/mol

En esta reacción, el carbono metílico del grupo acetilo se une al grupo carbonílico (C-2) del oxalacetato. El citril-CoA es un intermediario transitorio que se forma en el sitio activo del enzima (véase la Fig. 16–9) y que se hidroliza rápidamente a CoA y citrato libres, que a continuación abandonan el sitio activo. La hidrólisis de este intermediario tioéster de elevada energía hace que la reacción directa sea muy exergónica. La gran variación negativa de energía libre estándar asociada con la reacción de la citrato sintasa resulta esencial para el funcionamiento del ciclo a consecuencia, tal como se mencionó anteriormente, de la muy baja concentración de oxalacetato normalmente presente. El CoA liberado en esta reacción se recicla para participar en la descarboxilación oxidativa de otra molécula de piruvato a cargo del complejo de la PDH.

Se ha cristalizado la citrato sintasa de mitocondrias y se ha deducido su estructura mediante difracción de rayos X en presencia y ausencia de sustratos e inhibidores **(Fig 16–8)**. Cada subunidad del enzima homodimérico es una sola cadena polipeptídica con dos dominios, uno de ellos grande y rígido y el otro más pequeño y flexible. El sitio activo se sitúa entre los dos. El oxalacetato, primer sustrato que se une al enzima, induce un gran cambio de conformación en el dominio flexible, que provoca la aparición de un sitio de unión para el segundo sustrato, el acetil-CoA. Cuando se ha formado el citril-CoA en el sitio activo del enzima, otro cambio conformacional produce la hidrólisis del tioéster con liberación de CoA-SH. Este encaje inducido del enzima, primero con su sustrato y a continuación con su intermedio, disminuye la probabilidad de una rotura prematura e improductiva del enlace tioéster del acetil-CoA. Estudios cinéticos sobre el enzima están de acuerdo con este mecanismo bisustrato ordenado (véase la Fig. 6–13). La reacción catalizada por la citrato sintasa es, básicamente, una condensación de Claisen (p. 497), en la que interviene un tioéster (acetil-CoA) y una cetona (oxalacetato) **(Fig. 16–9)**.

② **Formación de isocitrato vía *cis*-aconitato** El enzima **aconitasa** (denominado formalmente **aconitato hidratasa**) cataliza la transformación reversible del citrato en **isocitrato** a través de la formación intermedia del ácido tricarboxílico ***cis*-aconitato,** que normalmente no se disocia del sitio activo. La aconitasa puede promover la adición reversible de H_2O al doble enlace del *cis*-aconitato unido al enzima mediante dos vías diferentes, de las que una conduce a citrato y la otra a isocitrato:

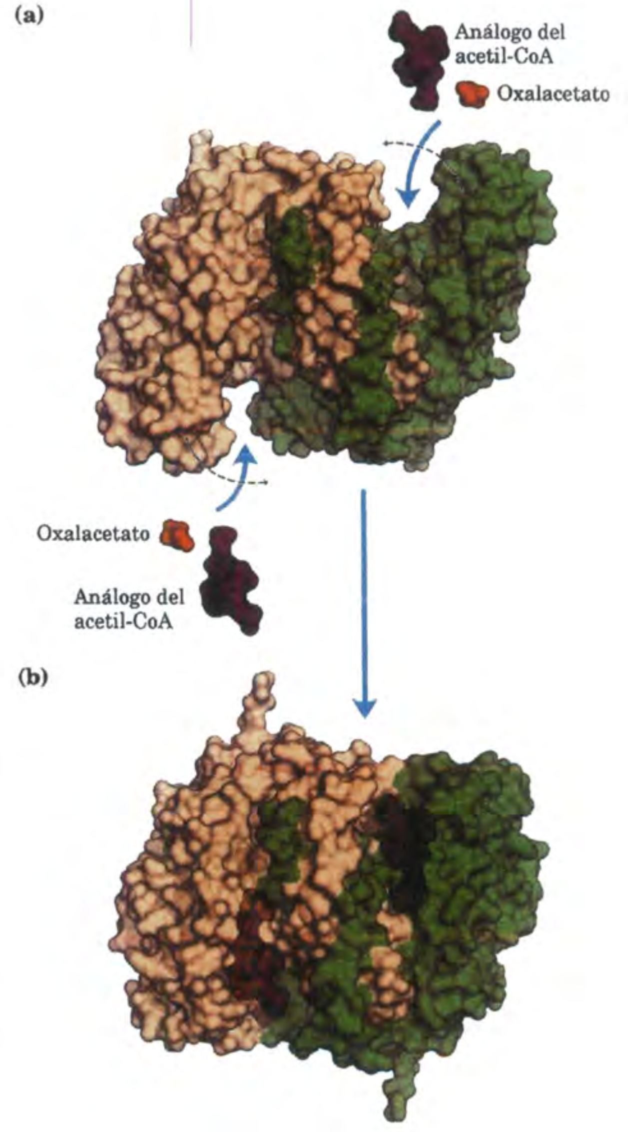
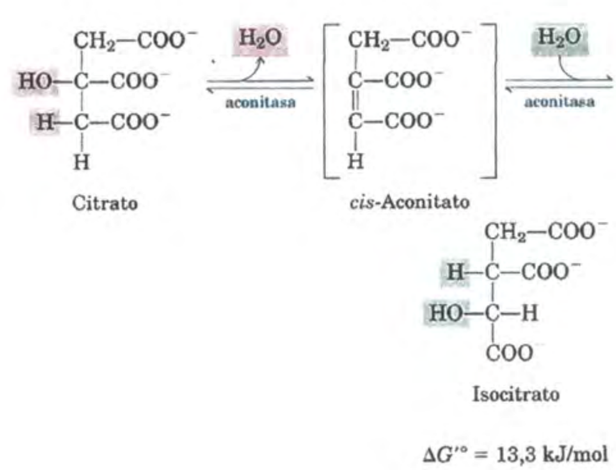
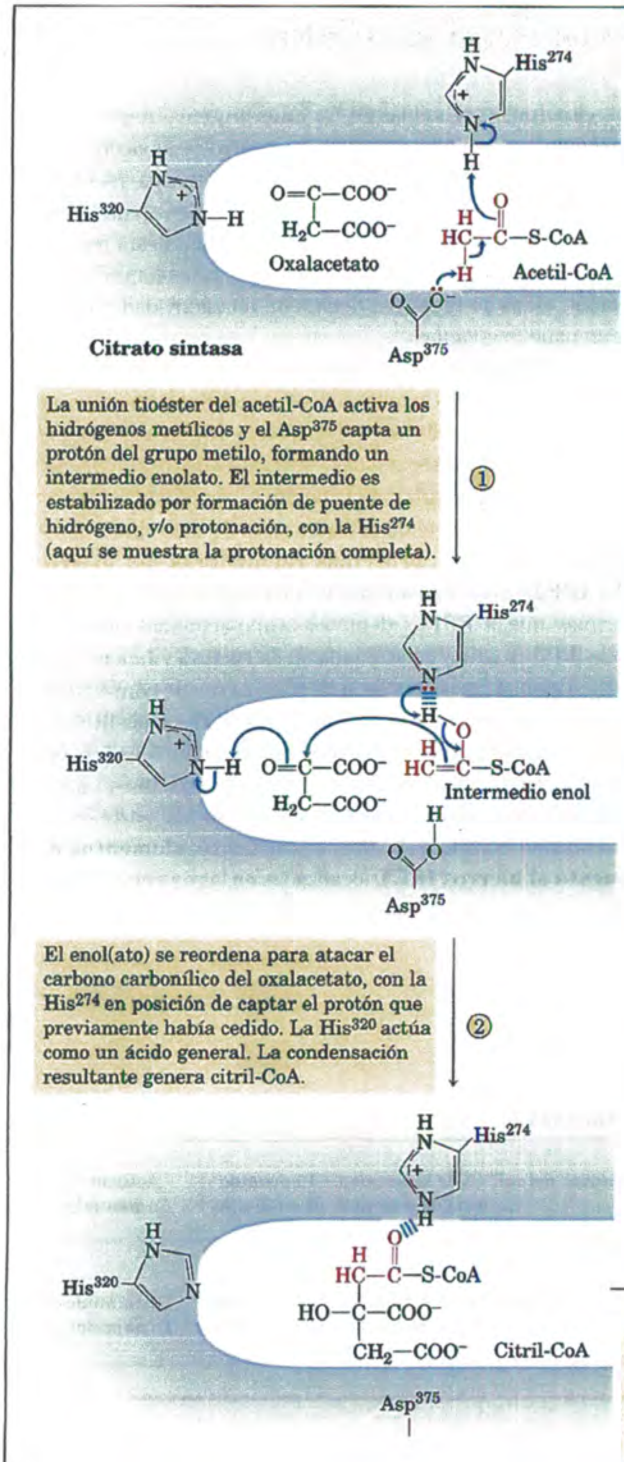
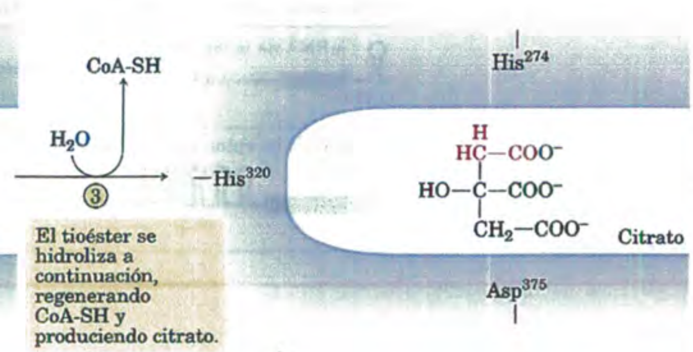


FIGURA 16–8 Estructura de la citrato sintasa. El dominio flexible de cada subunidad experimenta un gran cambio de conformación al unirse el oxalacetato, con lo que se crea un sitio de unión para el acetil-CoA. **(a)** Forma abierta del enzima solo (PDB ID 5CSC); **(b)** forma cerrada con oxalacetato y un análogo estable del acetil-CoA (carboximetil-CoA) unidos (obtenido de PDB ID 5CTS). En estas representaciones una subunidad se colorea en beige y la otra en verde.



$\Delta G'^{\circ} = 13{,}3$ kJ/mol





A pesar de que la mezcla en equilibrio a pH 7,4 y 25 °C contiene menos del 10% de isocitrato, en la célula la reacción transcurre hacia la derecha gracias a la rapidez del consumo de isocitrato en el siguiente paso del ciclo, lo que produce la disminución de su concentración en el estado estacionario. La aconitasa contiene un **centro ferro-sulfurado (Fig. 16–10)**, que actúa tanto en la fijación del sustrato en el sitio activo como en la adición o eliminación catalíticas de H_2O. En las células con carencia de hierro, la aconitasa pierde su centro ferro-sulfurado y adquiere un papel diferente en la regulación de la homeostasis del hierro. La aconitasa es uno de los muchos enzimas conocidos que "iluminan a la luz de la luna", es decir que tienen un segundo papel en condiciones alejadas del óptimo (Recuadro 16-1).

③ Oxidación del isocitrato a α-cetoglutarato y CO_2 En el paso siguiente la **isocitrato deshidrogenasa** cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato, dando lugar a la formación de **α-cetoglutarato (Fig. 16–11)**. El Mn^{2+} del sitio activo interacciona con el grupo carbonilo del intermedio oxalsuccinato que se forma fugazmente sin dejar el sitio de unión hasta que la descarboxilación lo convierte en α-cetoglutarato. El Mn^{2+} también estabiliza el enol formado transitoriamente por descarboxilación.

Hay dos formas diferentes de isocitrato deshidrogenasa en todas las células, una de las cuales requiere NAD^+ como acep-

FIGURA DE MECANISMO 16–9 Citrato sintasa. En la reacción de la citrato sintasa de mamíferos, el oxalacetato se une en primer lugar, en una secuencia de reacción estrictamente ordenada. Esta unión desencadena un cambio de conformación que abre el sitio de unión para el acetil-CoA. El oxalacetato se orienta específicamente en el sitio activo de la citrato sintasa por interacción de sus dos carboxilatos con dos residuos Arg cargados positivamente (no mostrados). **Mecanismo de la citrato sintasa**

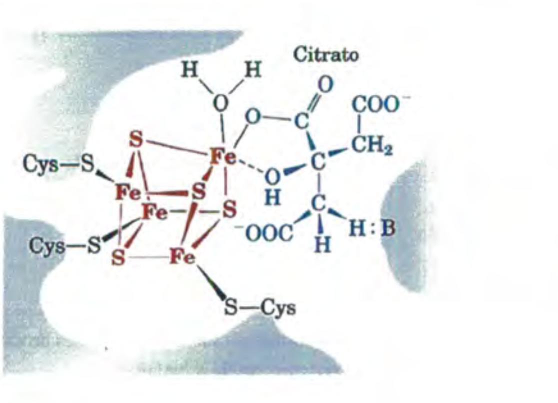


FIGURA 16–10 Centro ferro-sulfurado de la aconitasa. El centro ferro-sulfurado está en rojo y la molécula de citrato en azul. Tres residuos Cys del enzima unen tres átomos de hierro; el cuarto hierro está unido a uno de los grupos carboxilo del citrato y también interacciona de modo no covalente con un grupo hidroxilo del citrato (enlace a trazos). Un residuo básico (:B) en el enzima ayuda a posicionar el citrato en el sitio activo. El centro ferro-sulfurado actúa tanto en la unión del sustrato como en la catálisis. Las propiedades generales de las proteínas ferro-sulfuradas se estudian en el Capítulo 19 (véase la Fig. 19-5).

RECUADRO 16–1 Enzimas "claro de luna": proteínas con más de una función

El aforismo "un gen–un enzima", propuesto por George Beadle y Edward Tatum en 1940 (véase el Capítulo 24) no se puso en entredicho durante gran parte del siglo XX, lo mismo que la presunción asociada de que cada proteína tenía una única función. Pero en los últimos años se han descubierto muchas excepciones importantes a esta fórmula sencilla, casos en los que una única proteína codificada por un único gen realizaba claramente más de una función en la célula. La aconitasa es una de estas proteínas: actúa como un enzima al mismo tiempo que como reguladora de la síntesis de proteínas.

Las células eucarióticas tienen dos isozimas de la aconitasas. El isozima mitocondrial convierte el citrato en isocitrato en el ciclo del ácido cítrico. El isozima citosólico tiene dos funciones distintas. Cataliza la conversión el citrato en isocitrato, proporcionando el sustrato para una isocitrato deshidrogenasa citosólica que genera NADPH como poder reductor para la síntesis de ácidos grasos y otros procesos anabólicos en el citosol. También tiene un papel en la homeostasis celular del hierro.

Todas las células han de obtener hierro para la actividad de muchas proteínas que lo requieren como cofactor. En los humanos la carencia grave de hierro provoca anemia, un suministro insuficiente de eritrocitos y una capacidad reducida de transporte de oxígeno que puede poner en peligro la vida. Demasiado hierro también es nocivo: se acumula en el hígado, dañándolo en la hemocromatosis y en otras enfermedades. El hierro obtenido de la dieta se transporta en la sangre por la proteína **transferrina** y entra en las células mediante endocitosis facilitada por el **receptor de la transferrina.** Una vez en el interior de las células, el hierro se utiliza en la síntesis de los distintos hemos, citocromos, proteínas Fe-S y otras proteínas dependientes de hierro, al tiempo que el exceso de hierro se almacena unido a la proteína **ferritina.** Los niveles de transferrina, receptor de la transferrina y ferritina son, por tanto, básicos para la homeostasis del hierro. La síntesis de estas proteínas está regulada en función de la asequibilidad del hierro, y la aconitasa, en su función al "claro de luna" (es decir, con una actividad tenue), juega un papel regulador.

La aconitasa tiene un agrupamiento Fe-S en su sitio activo (véase la Fig. 16–10). Cuando una célula no tiene hierro, este agrupamiento Fe-S se disocia y el enzima pierde su actividad, la capacidad de unirse a secuencias específicas de los mRNA del receptor de la transferrina y de la ferritina, regulando así la síntesis de proteínas a nivel de la traducción. Se descubrieron independientemente dos **proteínas reguladoras del hierro, IRP1** y **IRP2,** como reguladoras del metabolismo del hierro. Se vio después que la IRP1 es idéntica a la apo-aconitasa citosólica y que la IRP2 está muy relacionada en estructura y función con la IRP1, si bien, a diferencia de la IRP1 no se puede convertir en aconitasa enzimáticamente activa. Tanto IRP1 como IRP2 se unen a regiones del mRNA que codifican la ferritina y el receptor de transferrina, con efectos sobre la movilización y captación de hierro. Estas secuencias de mRNA forman parte de las estructuras en horquilla (p. 285) denominadas **elementos de respuesta al hierro (IRE),** localizadas en los extremos 5′ y 3′

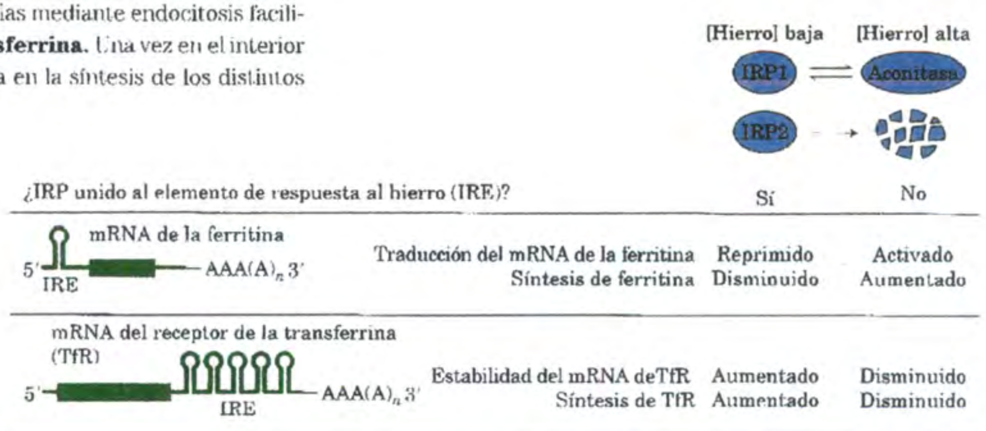


FIGURA 1 Efecto de IRP1 e IRP2 sobre los mRNA de ferritina y del receptor de la transferrina.

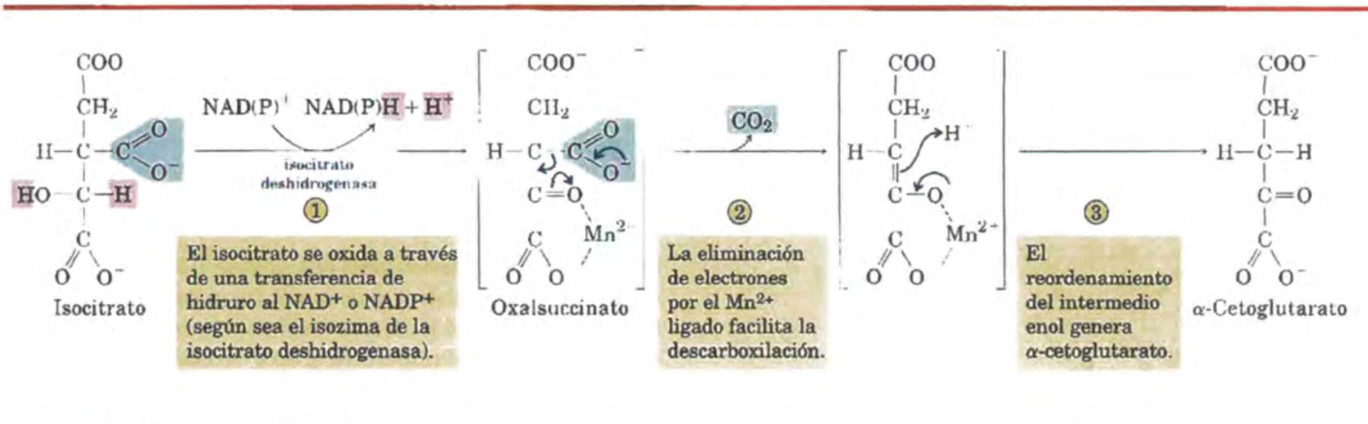


FIGURA DE MECANISMO 16–11 Isocitrato deshidrogenasa. En esta reacción el sustrato, isocitrato, pierde un carbono por descarboxilación oxidativa. Véase la Fig. 14–13 para más información sobre las reacciones de transferencia de hidruro en las que intervienen NAD^+ y $NADP^+$.

del mRNA (Fig. 1). Cuando están unidas a la secuencia 5′ sin traducir del IRE en el mRNA de la ferritina, las IRP bloquean la síntesis de ferritina; cuando están unidas a las secuencias 3′ no traducidas de los IRE en el mRNA del receptor de la transferrina, estabilizan el mRNA e impiden su degradación, permitiendo así la síntesis de más copias de la proteína receptora por molécula de mRNA. De este modo, en células con carencia de hierro, la captación de hierro es más eficiente y se reduce el almacenamiento de hierro (unido a ferritina). Cuando las concentraciones celulares de hierro vuelven a la normalidad, IRP1 se convierte en aconitasa e IRP2 experimenta degradación proteolítica, acabando la respuesta a la baja concentración de hierro.

La aconitasa enzimáticamente activa y la tenue apo-aconitasa reguladora tienen estructuras diferentes. Al igual que la aconitasa activa, la proteína tiene dos lóbulos que se cierran alrededor del agrupamiento Fe-S; al igual que IRP1, los dos lóbulos se abren exponiendo el sitio de unión del mRNA (Fig. 2).

La aconitasa es sólo uno de un número creciente de enzimas conocidos (o que se suponen) que tienen un segundo papel más tenue. En este grupo se incluyen muchos de los enzimas glucolíticos. La piruvato quinasa actúa en el nucleo regulando la transcripción de genes que responden a la hormona tiroidea. La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa tiene una actividad secundaria como uracilo DNA glucosilasa, efectuando la reparación del DNA dañado y como regulador de la transcripción de la histona H2B. El cristalino del ojo de los vertebrados tiene varios enzimas glucolíticos con funciones secundarias, entre los que se cuentan la fosfoglicerato quinasa, la triosa fosfato isomerasa y la lactato deshidrogenasa.

Hasta hace poco el descubrimiento de que una proteína tiene más de una función era cuestión del azar: dos grupos de investigadores que estudiaban dos cuestiones no relacionadas descubrieron que "sus" proteínas tenían propiedades similares, las compararon cuidadosamente y vieron que eran idénticas. Con el crecimiento de bases de datos catalogadas de secuencias de proteínas y de DNA se puede ahora buscar directamente proteínas con funciones secundarias explorando las bases de datos en busca de proteínas con la misma secuencia que la proteína objeto de estudio, pero con una función diferente. Esto quiere decir que en las bases de datos, una proteína a la que se ha adscrito una función determinada no necesariamente tiene *sólo* esta función. Esta variedad de funciones de una proteína puede explicar también algunos hallazgos sorprendentes: experimentos en los que una proteína con una función conocida se inactiva por mutación pero los organismos mutantes resultantes muestran un fenotipo que no tiene una relación evidente con aquella función.

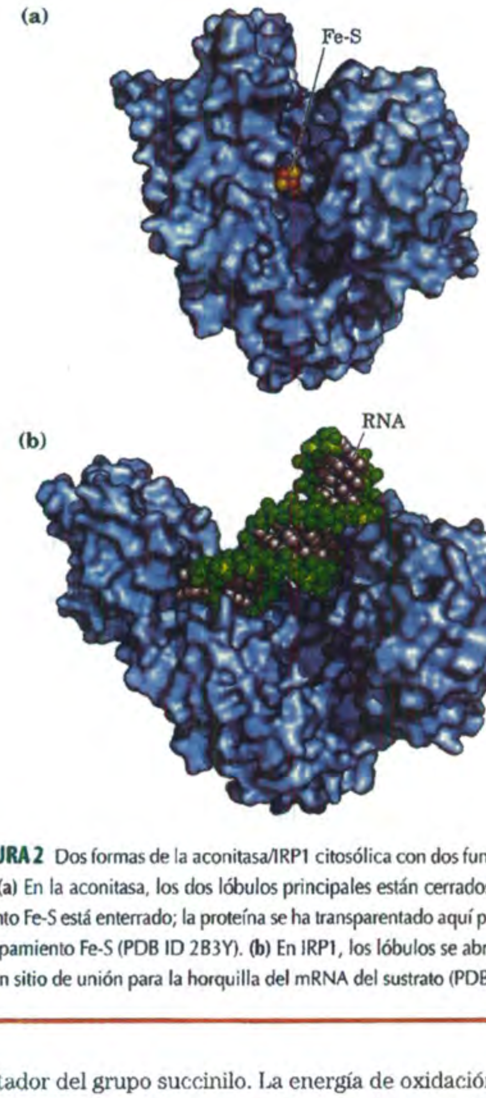


FIGURA 2 Dos formas de la aconitasa/IRP1 citosólica con dos funciones distintas. **(a)** En la aconitasa, los dos lóbulos principales están cerrados y el agrupamiento Fe-S está enterrado; la proteína se ha transparentado aquí para mostrar el agrupamiento Fe-S (PDB ID 2B3Y). **(b)** En IRP1, los lóbulos se abren exponiendo un sitio de unión para la horquilla del mRNA del sustrato (PDB ID 2IPY).

tor de electrones, mientras que la otra requiere $NADP^+$. Por lo demás, las reacciones globales son idénticas. En las células eucarióticas el enzima dependiente de NAD se encuentra en la matriz mitocondrial y actúa en el ciclo del ácido cítrico. El enzima dependiente de NADP se encuentra tanto en la matriz mitocondrial como en el citosol. Es posible que su función primordial sea la de producir NADPH, que es esencial en reacciones reductoras anabólicas.

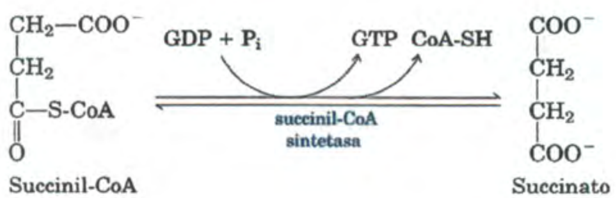
④ Oxidación del α-cetoglutarato a succinil-CoA y CO_2 El paso siguiente es otra descarboxilación oxidativa por la que el α-cetoglutarato se convierte en **succinil-CoA** y CO_2 por acción del **complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa**; el NAD^+ actúa como aceptor de electrones y el CoA es el transportador del grupo succinilo. La energía de oxidación del α-cetoglutarato se conserva gracias a la formación del enlace tioéster del succinil-CoA:

α-Cetoglutarato Succinil-CoA

$\Delta G'^{\circ} = -33{,}5$ kJ/mol

Esta reacción es virtualmente idéntica a la reacción de la piruvato deshidrogenasa discutida anteriormente, y el complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa es muy parecido al complejo de la PDH tanto en estructura como en función. Posee tres enzimas homólogos a E_1, E_2 y E_3 del complejo de la PDH, así como TPP unido al enzima y también lipoato, FAD, NAD y coenzima A. Ciertamente, ambos complejos provienen de un antepasado evolutivo común. A pesar de que los componentes E_1 de los dos complejos son estructuralmente similares, sus secuencias de aminoácidos son diferentes y tienen, por supuesto, diferente especificidad de unión: E_1 del complejo de la PDH une piruvato, y E_1 del complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa une α-cetoglutarato. Los componentes E_2 de los dos complejos son también muy similares; ambos poseen grupos lipoilo unidos covalentemente. Las subunidades E_3 de los dos complejos enzimáticos son idénticas.

⑤ Conversión de succinil-CoA en succinato El succinil-CoA, al igual que el acetil-CoA, tiene un enlace tioéster con una energía libre estándar de hidrólisis altamente negativa ($\Delta G'^{\circ} \approx -36$ kJ/mol). En el paso siguiente del ciclo del ácido cítrico, la energía liberada en la rotura de este enlace se utiliza para promover la síntesis de un enlace fosfoanhídrido del GTP o del ATP con una $\Delta G'^{\circ}$ neta de sólo $-2,9$ kJ/mol. En el proceso se forma **succinato:**



$$\Delta G'^{\circ} = -2,9 \text{ kJ/mol}$$

El enzima que cataliza esta reacción reversible se conoce como **succinil-CoA sintetasa** o **succínico tioquinasa;** ambos nombres indican la participación de un nucleósido trifosfato en la reacción (Recuadro 16-2).

Esta reacción conservadora de energía presenta un paso intermedio en el que la misma molécula de enzima queda fosforilada en un residuo His en el sitio activo **(Fig. 16–12a)**. Este

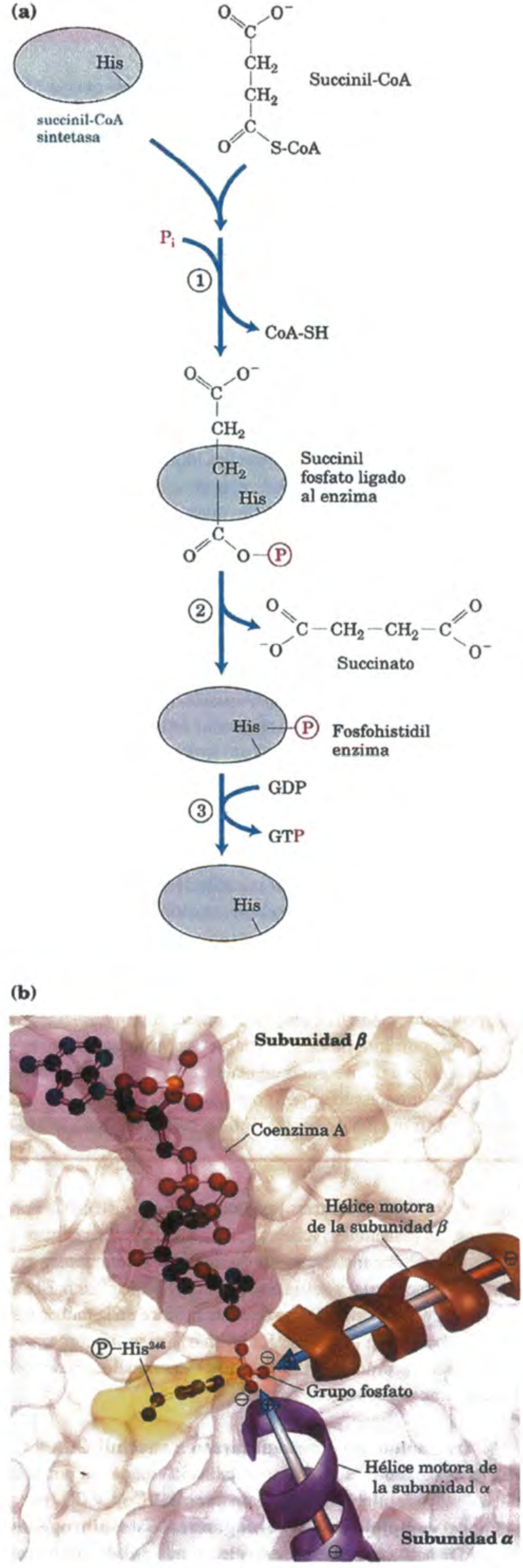


FIGURA 16–12 Reacción de la succinil-CoA sintetasa. (a) En el paso ① un grupo fosforilo sustituye al CoA del succinil-CoA unido al enzima, formando un acil fosfato de alta energía. En el paso ② el succinil fosfato dona el grupo fosforilo a un residuo His del enzima, formando un fosfohistidil enzima de elevada energía. En el paso ③ el grupo fosforilo se transfiere desde el residuo His al fosfato terminal del GDP (o ADP), formando GTP (o ATP). **(b)** Sitio activo de la succinil-CoA sintetasa de *E. coli* (de PDB ID 1SCU). El sitio activo incluye parte de las subunidades α (azul) y β (marrón). Las hélices motoras (azul, marrón) sitúan las cargas positivas parciales del dipolo helicoidal cerca del grupo fosfato de Ⓟ – His^{246} de la cadena α, estabilizando el fosfohistidil enzima. Los enzimas bacteriano y de mamíferos presentan secuencias de aminoácidos y estructuras tridimensionales parecidas.

RECUADRO 16–2 Sintasas y sintetasas; ligasas y liasas; quinasas, fosfatasas y fosforilasas: ¡sí, una nomenclatura confusa!

La citrato sintasa es uno de los muchos enzimas que catalizan reacciones de condensación, dando un producto más complejo desde el punto de vista químico que sus precursores. Las **sintasas** catalizan reacciones de condensación en las que no se requiera ningún nucleósido trifosfato (ATP, GTP, etc.) como fuente energética. Las **sintetasas** catalizan condensaciones que *sí* utilizan ATP u otro nucleósido trifosfato como fuente de energía para la reacción de síntesis. La succinil-CoA sintetasa es un ejemplo de estos enzimas. Las **ligasas** (del latin *ligare*, "unir") son enzimas que catalizan reacciones de condensación en las que dos átomos son unidos utilizando la energía del ATP u otra fuente energética. (Así pues, las sintetasas son ligasas). La DNA ligasa, por ejemplo, une los cortes que encuentra en moléculas de DNA con la energía proporcionada por el ATP o el NAD^+; es ampliamente utilizada en la unión de fragmentos de DNA en ingeniería genética. Las ligasas no deben ser confundidas con las **liasas,** que catalizan rupturas (o en el sentido inverso, adiciones) en las que tienen lugar reordenamientos electrónicos. El complejo de la PDH, que escinde oxidativamente CO_2 a partir de piruvato, es un miembro de esta gran familia de enzimas.

El nombre **quinasa** se aplica a enzimas que transfieren un grupo fosforilo desde un nucleósido trifosfato tal como el ATP a una molécula aceptora: un azúcar (como en la hexoquinasa y en la glucoquinasa), una proteína (como en la glucogéno fosforilasa quinasa), otro nucleótido (como en la nucleósido difosfato quinasa) o un intermediario metabólico como el oxalacetato (en la PEP carboxiquinasa). La reacción catalizada por una quinasa es una *fosforilación*. Por otro lado, la *fosforólisis* es una reacción de desplazamiento en la que el fosfato es la especie atacante que se une covalentemente al punto de ruptura de enlace. Estas reacciones estan catalizadas por **fosforilasas.** La glucógeno fosforilasa, por ejemplo, cataliza la fosforólisis del glucógeno, produciendo glucosa 1-fosfato. La *desfosforilación*, eliminación de un grupo fosforilo de un éster fosfato en la que el agua es la especie atacante, está catalizada por **fosfatasas**. La fructosa bisfosfatasa-1 convierte la fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato en la gluconeogénesis, y la fosforilasa *a* fosfatasa elimina grupos fosforilo de las fosfoserinas de la glucógeno fosforilasa fosforilada. ¡Uau!

Desgraciadamente, estas descripciones de las clases de enzimas se solapan y muchos son denominados por dos o más nombres. La succinil-CoA sintetasa, por ejemplo, es conocida también como succinato tioquinasa; el enzima es una sintetasa en el ciclo del ácido cítrico y una quinasa cuando actúa en la dirección de la síntesis de succinil-CoA. Esto origina una nueva fuente de confusión en la nomenclatura de los enzimas. Un enzima puede haber sido descubierto gracias a un ensayo enzimático en el que, por ejemplo, A se convierte en B. El enzima recibe entonces un nombre por dicha reacción. Sin embargo, se puede llegar a demostrar en trabajos posteriores que en la célula el enzima actúa mayoritariamente convirtiendo B en A. Normalmente continúa utilizándose el nombre inicial aun cuando el papel metabólico del enzima estaría mejor descrito si lo llamáramos en virtud de la reacción opuesta. El enzima glucolítico piruvato quinasa ilustra esta situacion (p. 538). Para un principiante en el campo de la bioquímica, esta duplicación de la nomenclatura puede ser desconcertante. Comités internacionales han hecho esfuerzos heroicos para sistematizar la nomenclatura enzimática (véase la Tabla 6–3 para un breve resumen del sistema), pero algunos nombres sistemáticos han demostrado ser demasiado largos, de difícil manejo y de uso no muy frecuente en conversaciones bioquímicas.

En este libro hemos intentado utilizar para cada enzima el nombre más frecuentemente utilizado entre los bioquímicos y señalar aquellos casos en los que recibe más de un nombre. Para información más actualizada sobre la nomenclatura enzimática diríjase a las recomendaciones de The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/nomenclature/).

---

grupo fosforilo, que posee un elevado potencial de transferencia de grupo, es transferido a ADP (o bien GDP) para formar ATP (o bien GTP). Las células animales tienen dos isozimas de la succinil-CoA sintetasa, uno específico para ADP y otro para GDP. El enzima tiene dos subunidades, la α (M_r 32.000), que contiene el residuo Ⓟ–His (His^{246}) y el sitio de unión para el CoA, y la β (M_r 42.000), que confiere especificidad por ADP o GDP. El sitio activo se encuentra en la interfase entre subunidades.

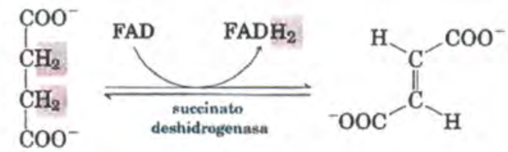
La estructura cristalina de la succinil-CoA sintetasa revela la presencia de dos "hélices motoras" (una en cada subunidad), orientadas de manera que sus dipolos eléctricos exponen cargas positivas parciales cerca de la Ⓟ–His cargada negativamente (Fig. 16–12b), estabilizando de este modo el intermedio fosfoenzimático. (Tenga en cuenta el papel similar de los dipolos de hélice al estabilizar los iones K^+ en el canal de K^+; véase la Fig 11-48).

La formación de ATP (o GTP) a expensas de la energía liberada por la descarboxilación oxidativa del α-cetoglutarato es una fosforilación a nivel de sustrato, como la síntesis de ATP en las reacciones glucolíticas catalizadas por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la piruvato quinasa (véase la Fig. 14–2). El GTP formado por la succinil-CoA sintetasa puede donar su grupo fosfato terminal al ADP para formar ATP, en una reacción reversible catalizada por la **nucleósido difosfato quinasa** (p. 510):

$$\text{GTP} + \text{ADP} \longrightarrow \text{GDP} + \text{ATP} \qquad \Delta G'^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$$

Así, el resultado neto de la actividad de los dos isozimas de la succinil-CoA sintetasa es la conservación de la energía en forma de ATP. No hay ninguna variación de energía libre en la reacción de la nucleósido difosfato quinasa; el ATP y el GTP son energéticamente equivalentes.

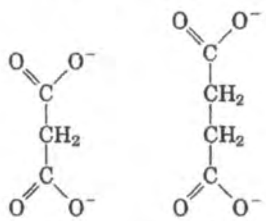
⑥ Oxidación del succinato a fumarato El succinato formado a partir de succinil-CoA se oxida a **fumarato** por la flavoproteína **succinato deshidrogenasa:**



Succinato   Fumarato

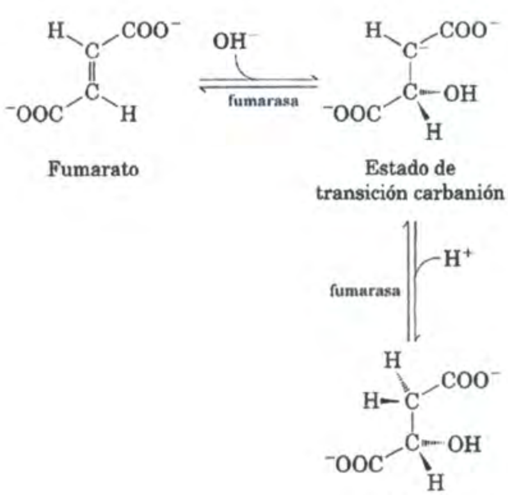
$$\Delta G'^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$$

En eucariotas, la succinato deshidrogenasa se encuentra unida fuertemente a la membrana mitocondrial interna (en bacterias, a la membrana plasmática). El enzima contiene tres agrupaciones de hierro-azufre diferentes y una molécula de FAD unida covalentemente (véase la Fig. 19–10). Los electrones pasan desde el succinato a través del FAD y los centros ferrosulfurados antes de entrar en la cadena de transportadores electrónicos en la membrana mitocondrial interna (la membrana plasmática en bacterias). El flujo de electrones a través de estos transportadores desde el succinato hasta el aceptor final, el O_2, está acoplado a la síntesis de aproximadamente 1,5 moléculas de ATP por par de electrones (fosforilación ligada a la respiración). El malonato, un análogo del succinato que no se encuentra normalmente en las células, es un fuerte inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa y por lo tanto su adición a la mitocondria bloquea el ciclo del ácido cítrico.



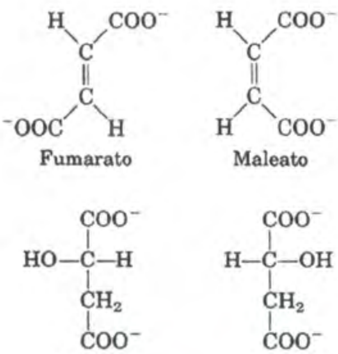
Malonato   Succinato

⑦ Hidratación del fumarato a malato La hidratación reversible del fumarato a **L-malato** está catalizada por la **fumarasa** (formalmente **fumarato hidratasa**). El estado de transición en esta reacción es un carbanión:



$$\Delta G'^{\circ} = -3{,}8 \text{ kJ/mol}$$

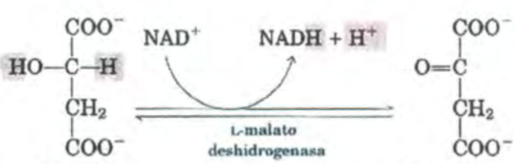
Este enzima es altamente estereoespecífico; cataliza la hidratación del doble enlace en trans del fumarato, pero no el doble enlace en *cis* del maleato (el isómero *cis* del fumarato). En la dirección inversa (de D-malato a fumarato), la fumarasa es igualmente estereoespecífica: el D-malato no es un sustrato.



Fumarato   Maleato

L-Malato   D-Malato

⑧ Oxidación del malato a oxalacetato En la última reacción del ciclo del ácido cítrico, la **L-malato deshidrogenasa** ligada a NAD cataliza la oxidación del L-malato a oxalacetato:



L-Malato   Oxalacetato

$$\Delta G'^{\circ} = 29{,}7 \text{ kJ/mol}$$

El equilibrio de esta reacción se encuentra muy desplazado hacia la izquierda en condiciones termodinámicas estándar, pero en células intactas el oxalacetato es eliminado continuamente por la reacción altamente exergónica de la citrato sintasa (etapa ① de la Fig. 16–7). Esto mantiene la concentración intracelular de oxalacetato extremadamente baja ($<10^{-6}$ M), lo que empuja la reacción de la malato deshidrogenasa hacia la formación de oxalacetato.

Aunque las reacciones individuales del ciclo del ácido cítrico fueron deducidas inicialmente in vitro utilizando tejido muscular desmenuzado, la vía y su regulación han sido también estudiadas extensamente in vivo. Utilizando precursores marcados radiactivamente, tales como el [^{14}C]piruvato y [^{14}C]acetato, los investigadores han trazado el destino de los átomos de carbono individuales a través del ciclo del ácido cítrico. Algunos de los primeros experimentos con isótopos produjeron, sin embargo, un resultado inesperado y conllevaron una considerable controversia sobre la vía y el mecanismo del ciclo del ácido cítrico. De hecho, estos experimentos parecían confirmar al principio que el citrato no era el primer ácido tricarboxílico formado. El Recuadro 16–3 da algunos detalles sobre este episodio en la historia de la investigación del ciclo del ácido cítrico. El flujo metabólico a través del ciclo puede ser ahora seguido en tejido vivo utilizando precursores marcados con el isótopo ^{13}C, y espectroscopia RMN del tejido entero. Debido a que la señal de RMN es única para el compuesto que

RECUADRO 16-3 Citrato: una molécula simétrica que reacciona asimétricamente

Hace unos 60 años se pudo obtener compuestos enriquecidos con el isótopo pesado del carbono ^{13}C y con los isótopos radiactivos ^{11}C y ^{14}C. Fue a partir de ese momento que se emplearon para realizar el seguimiento de los átomos de carbono a lo largo del ciclo del ácido cítrico. Uno de los experimentos llevados a cabo inició la controversia acerca del papel del citrato. Se incubó aeróbicamente acetato, cuyo grupo carboxilo había sido marcado radiactivamente (designado como [1-^{14}C] acetato), con un preparado de tejido animal. El acetato se convierte enzimáticamente en acetil-CoA en tejidos animales, y el camino recorrido dentro del ciclo por el carbono carboxílico marcado del grupo acetilo pudo ser seguido en las reacciones del ciclo. Se aisló α-cetoglutarato del tejido después de la incubación y luego se degradó a partir de reacciones químicas conocidas con tal de establacer la posición (o posiciones) del carbono isotópico.

A partir de la condensación de oxalacetato no marcado, con acetato cuyo grupo carboxílico está marcado cabría esperar obtener citrato marcado en uno de los dos grupos carboxilo primarios. La molécula de citrato es simétrica, con sus dos grupos carboxílicos terminales químicamente indistinguibles. Así pues, se esperaba que la mitad de la moléculas de citrato marcadas acabaran dando α-cetoglutarato marcado en el grupo α-carboxílico y que la otra mitad diera lugar a α-cetoglutarato marcado en el grupo γ-carboxílico; es decir, que el α-cetoglutarato formado debería ser una mezcla de los dos tipos de moléculas marcadas (Fig. 1, rutas ① y ②). Contrariamente a lo esperado, el α-cetoglutarato aislado de la suspensión de tejido contenía ^{14}C únicamente en el grupo γ-carboxílico (Fig. 1, ruta ①). Los investigadores concluyeron que el citrato (o cualquier otra molécula simétrica) no podía ser un intermediario en la vía metabólica que transfoma acetato en α-cetoglutarato; antes bien, un ácido tricarboxílico asimétrico, probablemente *cis*-aconitato o isocitrato, debía ser el primer producto formado a partir de la condensación de acetato con oxalacetato.

Sin embargo, en 1948 Alexander Ogston señaló que a pesar de que el citrato no posee ningún centro quiral (véase la Fig. 1–19), tiene el *potencial* para reaccionar asimétricamente si el enzima con el que interacciona presenta un sitio activo asimétrico. Sugirió que el sitio activo de la aconitasa tendría tres puntos de anclaje por los que la molécula de citrato quedaría unida y que el citrato ha de experimentar una unión específica a estos sitios de unión. Como se ve en la Figura 2, la unión del citrato a esos tres puntos de anclaje sólo podría darse de una manera, y esto explicaría la obtención de un solo tipo de α-cetoglutarato marcado. Moléculas orgánicas como el citrato que no presentan un centro quiral pero que son potencialmente capaces de reaccionar asimétricamente con un sitio activo asimétrico se denominan actualmente **moléculas proquirales.**

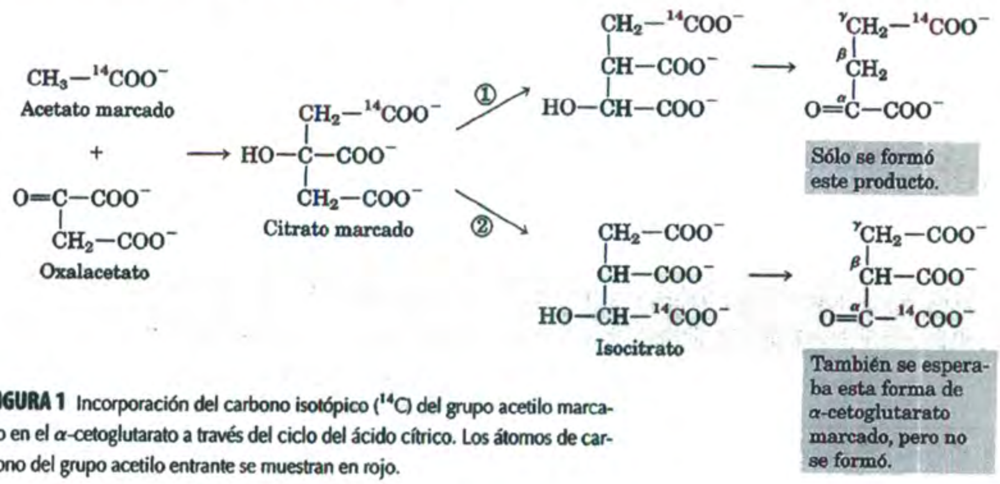


FIGURA 1 Incorporación del carbono isotópico (^{14}C) del grupo acetilo marcado en el α-cetoglutarato a través del ciclo del ácido cítrico. Los átomos de carbono del grupo acetilo entrante se muestran en rojo.

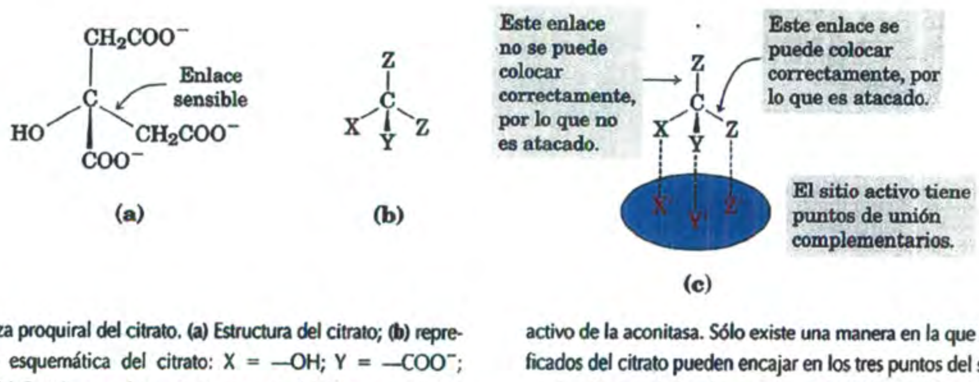


FIGURA 2 Naturaleza proquiral del citrato. (a) Estructura del citrato; (b) representación de forma esquemática del citrato: X = —OH; Y = —COO$^-$; Z = —CH_2COO^-. (c) Encaje complementario correcto del citrato en el sitio activo de la aconitasa. Sólo existe una manera en la que los tres grupos especificados del citrato pueden encajar en los tres puntos del sitio de unión. De este modo sólo uno de los dos grupos —CH_2COO^- está unido a la aconitasa.

contiene ^{13}C, los bioquímicos pueden seguir el movimiento de los átomos de carbono precursores hasta cada intermediario del ciclo, y hasta los compuestos derivados de estos intermediarios. Es una técnica muy prometedora para el estudio de la regulación del ácido cítrico y sus interconexiones con otras vías metabólicas tales como la glucólisis.

La energía de las oxidaciones del ciclo se conserva eficientemente

Hemos cubierto hasta ahora una vuelta completa al ciclo del ácido cítrico **(Fig. 16–13)**. Un grupo acetilo de dos átomos de carbono entró en el ciclo combinándose con el oxalacetato. Dos átomos de carbono salieron del ciclo como CO_2 debido a la oxidación del isocitrato y el α-cetoglutarato. La energía liberada en estas oxidaciones se conservó reduciendo tres NAD^+ y un FAD, y la producción de un ATP o GTP. Al final del ciclo se regeneró una molécula de oxalacetato. Obsérvese que los dos átomos de carbono que aparecen como CO_2 no son los mismos átomos de carbono que entraron en forma de grupo acetilo; se precisan más vueltas alrededor del ciclo para liberar estos átomos de carbono como CO_2 (Fig. 16–7).

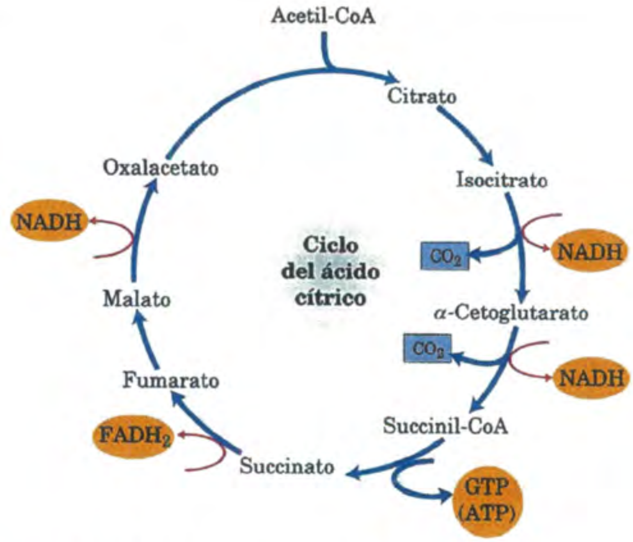


FIGURA 16–13 Productos de una vuelta del ciclo del ácido cítrico. En cada vuelta del ciclo se liberan tres móleculas de NADH, una de $FADH_2$, una de GTP (o ATP) y dos de CO_2 en reacciones de descarboxilación oxidativa. Aquí y en diversas figuras siguientes, todas las reacciones del ciclo se muestran sólo en una dirección, pero hay que recordar que la mayoría de reacciones son reversibles (véase la Fig. 16–7).

A pesar de que el ciclo del ácido cítrico en sí genera directamente sólo un ATP por vuelta (en la conversión de succinil-CoA a succinato), los cuatro pasos de oxidación en el ciclo proporcionan un gran flujo de electrones hacia la cadena respiratoria vía NADH y $FADH_2$ y de este modo posibilita la formación de un gran número de moléculas de ATP durante la fosforilación oxidativa.

En el Capítulo 14 vimos que el rendimiento energético de la producción de dos moléculas de piruvato a partir de una molécula de glucosa en la glucólisis es de 2 ATP y 2 NADH. En la fosforilación oxidativa (Capítulo 19), el paso de dos electrones desde el NADH al O_2 conduce a la formación de unos 2,5 ATP, y el paso de dos electrones desde el $FADH_2$ al O_2 rinde alrededor de 1,5 ATP. Esta estequiometría nos permite calcular el rendimiento global de ATP en la oxidación completa de la glucosa. Cuando ambas moléculas de piruvato se oxidan a seis CO_2 vía el complejo de la piruvato deshidrogenasa y el ciclo del ácido cítrico, y se transfieren los electrones al O_2 vía fosforilación oxidativa, se obtienen hasta 32 ATP por glucosa (Tabla 16–1). En números redondos, esto representa la conservación de $32 \times 30{,}5$ kJ/mol = 976 kJ/mol, o el 34% del máximo teórico de

TABLA 16–1 Estequiometría de la reducción de coenzimas y de formación de ATP en la oxidación aeróbica de la glucosa vía glucólisis, reacción del complejo de la piruvato deshidrogenasa, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa

Reacción	Número de ATP o coenzima reducido formado directamente	Número de ATP finalmente formado*
Glucosa ⟶ glucosa 6-fosfato	−1 ATP	−1
Fructosa 6-fosfato ⟶ fructosa 1,6-bisfosfato	−1 ATP	−1
2 Gliceraldehído 3-fosfato ⟶ 2 1,3-bisfosfoglicerato	2 NADH	3 o 5†
2 1,3-Bisfosfoglicerato ⟶ 2 3-fosfoglicerato	2 ATP	2
2 Fosfoenolpiruvato ⟶ 2 piruvato	2 ATP	2
2 Piruvato ⟶ 2 acetil-CoA	2 NADH	5
2 Isocitrato ⟶ 2 α-cetoglutarato	2 NADH	5
2 α-Cetoglutarato ⟶ 2 succinil-CoA	2 NADH	5
2 Succinil-CoA ⟶ 2 succinato	2 ATP (o 2 GTP)	2
2 Succinato ⟶ 2 fumarato	2 $FADH_2$	3
2 Malato ⟶ 2 oxalacetato	2 NADH	5
Total		30–32

*Se calcula la obtención de 2,5 ATP por NADH y 1,5 ATP por $FADH_2$. Un valor negativo indica consumo.

†Este número es 3 o 5 según el mecanismo utilizado para lanzar equivalentes de NADH desde el citosol a la matriz mitocondrial; véanse las Figuras 19–30 y 19–31.

2.840 kJ/mol disponibles de la oxidación completa de la glucosa. Estos cálculos usan las variaciones de energía libre estándar; cuando se corrige por la energía libre real necesaria para sintetizar ATP dentro de las células (véase el Ejemplo práctico 13-2), la eficiencia calculada para este proceso es de aproximadamente el 65%.

¿Por qué es tan complicada la oxidación del acetato?

El proceso cíclico de ocho pasos para la oxidación de grupos acetilo simples de dos átomos de carbono a CO_2 puede parecer innecesariamente complicado y no en consonancia con el principio biológico de máxima economía. Sin embargo, el papel del ciclo del ácido cítrico no está confinado a la oxidación del acetato. Esta vía metabólica constituye el centro del metabolismo intermediario. Productos finales de cuatro y cinco átomos de carbono procedentes de muchos procesos catabólicos alimentan el ciclo y sirven como combustibles. El oxalacetato y el α-cetoglutarato, por ejemplo, se producen a partir de aspartato y glutamato, respectivamente, durante la degradación de las proteínas. Bajo ciertas circunstancias metabólicas, los intermediarios son retirados del ciclo para ser utilizados como precursores en una multitud de vías biosintéticas.

El ciclo del ácido cítrico, como todas las otras vías metabólicas, es producto de la evolución, y gran parte de esta evolución tuvo lugar antes de la aparición de organismos aeróbicos. No representa necesariamente la vía *más corta* desde el acetato a CO_2, pero es la vía que, a través del tiempo, ha conferido las mayores ventajas selectivas. Los organismos anaerobios primitivos utilizaron muy probablemente algunas de las reacciones del ciclo del ácido cítrico en procesos biosintéticos lineales. De hecho, algunos microorganismos anaeróbicos modernos utilizan un ciclo del ácido cítrico incompleto como fuente, no de energía, sino de precursores biosintéticos **(Fig. 16–14)**. Estos organismos utilizan las tres primeras reacciones del ciclo para sintetizar α-cetoglutarato pero al carecer de α-cetoglutarato deshidrogenasa no pueden llevar a cabo el conjunto completo de reacciones del ciclo del ácido cítrico. Poseen los cuatro enzimas que catalizan la conversión reversible de oxalacetato en succinil-CoA, y pueden sintetizar malato, fumarato, succinato y succinil-CoA a partir de oxalacetato en un sentido inverso a la dirección "normal" (oxidativa) de flujo a través ciclo. Esta ruta es una fermentación, con el NADH producido en la oxidación del isocitrato reciclado a NAD^+ mediante la reducción del oxalacetato a succinato.

Con la evolución de las cianobacterias que producían O_2 a partir de agua, la atmósfera de la Tierra se transformó en aeróbica y los organismos estuvieron bajo una presión selectiva para desarrollar un metabolismo aeróbico que, como hemos visto, es mucho más eficiente que la fermentación anaeróbica.

Importante para inetgración

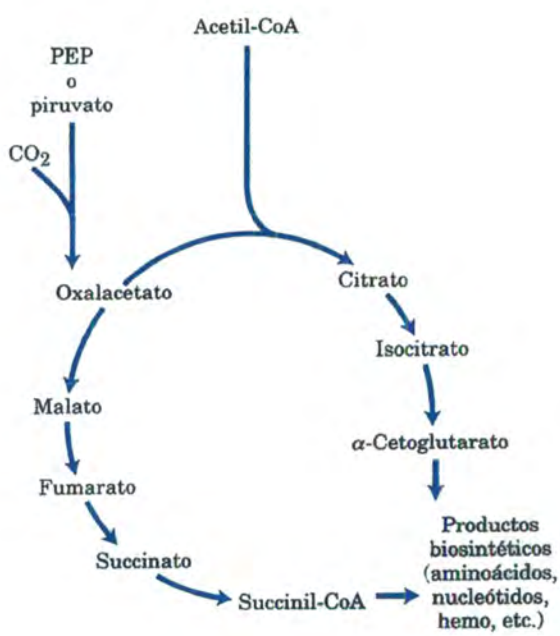


FIGURA 16–14 Precursores biosintéticos producidos en un ciclo del ácido cítrico incompleto en bacterias anaeróbicas. Estos anaerobios carecen de α-cetoglutarato deshidrogenasa por lo que no pueden completar el ciclo del ácido cítrico. El α-cetoglutarato y el succinil-CoA sirven de precursores en una gran variedad de rutas biosintéticas. (Véase la Fig. 16–13 para la dirección "normal" de estas reacciones en el ciclo del ácido cítrico.)

Los componentes del ciclo del ácido cítrico son importantes intermediarios biosintéticos

En organismos aeróbicos, el ciclo del ácido cítrico es una **ruta anfibólica,** es decir, que sirve tanto para procesos anabólicos como catabólicos. Aparte de su papel en el catabolismo oxidativo de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos, el ciclo proporciona precursores para muchas vías biosintéticas **(Fig. 16–15)**, a través de reacciones que cumplían el mismo propósito en nuestros antepasados anaeróbicos. El α-cetoglutarato y el oxalacetato pueden, por ejemplo, servir como precursores de los aminoácidos aspartato y glutamato por simple transaminación (Capítulo 22). A través del aspartato y glutamato, los átomos de carbono del oxalacetato y del α-cetoglutarato se utilizan entonces para sintetizar otros aminoácidos así como nucleótidos de purina y pirimidina. El oxalacetato se convierte en glucosa mediante la gluconeogénesis (véase la Fig. 15–11). El succinil-CoA es un intermediario central en la síntesis del anillo de porfirina de los grupos hemo, que actúan como transportadores de oxígeno (en la hemoglobina y mioglobina) y de transportadores de electrones (en los citocromos) (véase la Fig. 22–23). El citrato producido por algunos organismos se utiliza comercialmente para una multitud de usos (Recuadro 16–4).

Las reacciones anapleróticas reponen los intermediarios del ciclo del ácido cítrico

A medida que los intermediarios del ciclo del ácido cítrico son retirados para servir como precursores biosintéticos, son repuestos mediante **reacciones anapleróticas** (Fig. 16–15; Tabla 16–2). En circunstancias normales, las reacciones mediante las cuales intermediarios del ciclo se dirigen hacia otras vías y aquellas que permiten reponerlos se encuentran en equilibrio dinámico. Así pues, las concentraciones de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico permanecen prácticamente constantes.

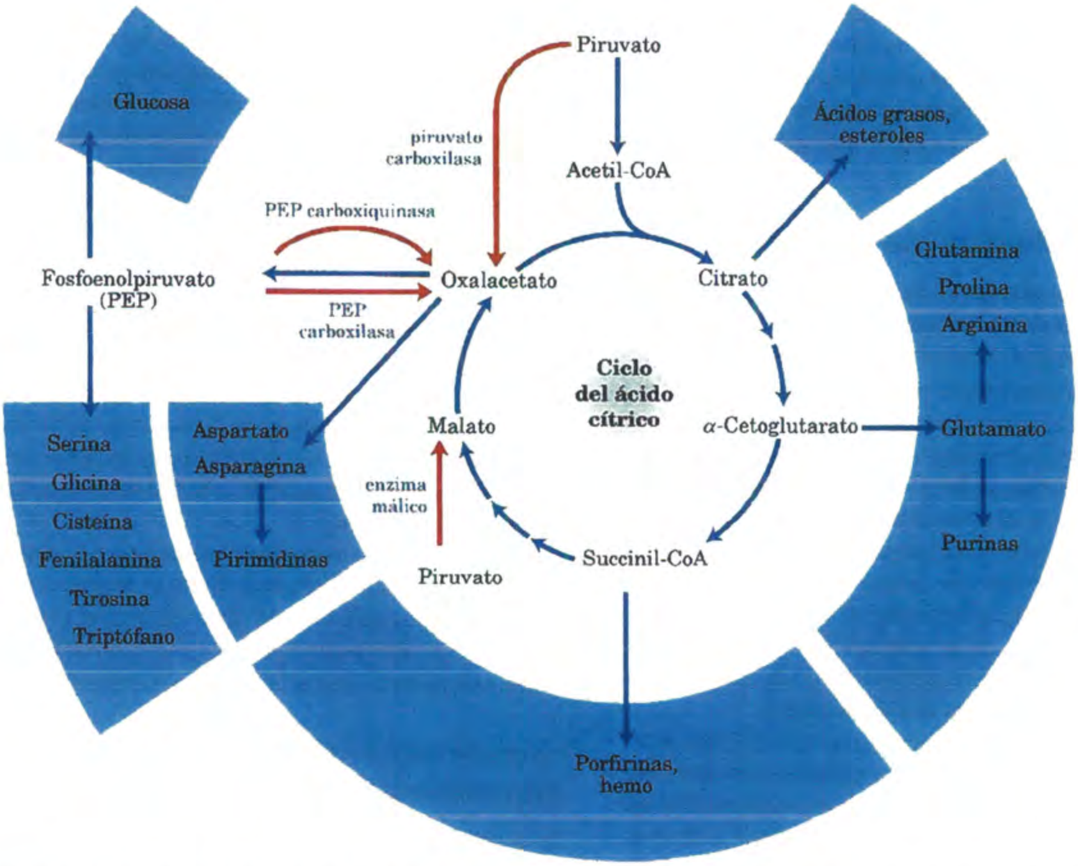


FIGURA 16–15 Papel del ciclo del ácido cítrico en el anabolismo. Se extraen muchos intermediarios del ciclo del ácido cítrico como precursores en muchas rutas biosintéticas. En rojo se muestran cuatro reacciones anapleróticas que rellenan los precursores agotados (véase la Tabla 16-2).

La tabla 16–2 muestra las reacciones anapleróticas más comunes; todas ellas convierten piruvato o fosfoenolpiruvato en oxalacetato o malato en diversos tejidos y organismos. La reacción anaplerótica más importante en hígado y riñon de mamíferos es la carboxilación reversible del piruvato por el CO_2 para formar oxalacetato, catalizada por la **piruvato carboxilasa**. Cuando el ciclo del ácido cítrico carece de oxalacetato o de algún otro intermediario, se carboxila piruvato para producir más oxalacetato. La adición enzimática de un grupo carboxilo al piruvato requiere energía, que es aportada por el ATP; la energía libre necesaria para adicionar un grupo carboxilo al piruvato es aproximadamente igual a la energía libre disponible en el ATP.

La piruvato carboxilasa es un enzima regulador y se encuentra prácticamente inactivo en ausencia de acetil-CoA, su modulador alostérico positivo. Siempre que el acetil-CoA, el combustible del ciclo del ácido cítrico, está presente en exceso, se estimula la reacción de la piruvato carboxilasa para producir más oxalacetato, lo que permite que el ciclo utilice más acetil-CoA en la reacción de la citrato sintasa.

Las otras reacciones anapleróticas mostradas en la Tabla 16–2 están también reguladas para mantener el nivel de intermediarios suficientemente elevado como para sostener la actividad del ciclo del ácido cítrico. La fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa, por ejemplo, es activada por el intermediario glucolítico fructosa 1,6-bisfosfato, que se acumula cuando el ciclo del

TABLA 16–2 Reacciones anapleróticas

Reacción	Tejido(s)/organismo(s)
Piruvato + HCO_3^- + ATP $\xrightleftharpoons{\text{piruvato carboxilasa}}$ oxalacetato + ADP + P_i	Hígado, riñón
Fosfoenolpiruvato + CO_2 + GDP $\xrightleftharpoons{\text{PEP carboxiquinasa}}$ oxalacetato + GTP	Corazón, músculo esquelético
Fosfoenolpiruvato + HCO_3^- $\xrightleftharpoons{\text{PEP carboxilasa}}$ oxalacetato + P_i	Plantas superiores, levaduras, bacterias
Piruvato + HCO_3^- + NAD(P)H $\xrightleftharpoons{\text{enzima málico}}$ malato + $NAD(P)^+$	Ampliamente distribuido en eucariotas y bacterias

RECUADRO 17-4 Citrato sintasa, limonada y suministro mundial de alimentos

El citrato tiene un gran número de aplicaciones industriales importantes. Un análisis rápido de los ingredientes de la mayoría de refrescos revela un uso habitual de ácido cítrico que le confiere un gusto ácido o afrutado. El ácido cítrico también se utiliza como plastificante y como inhibidor de la formación de espuma en la fabricación de ciertas resinas, como mordiente para colores brillantes y como antioxidante para preservar el gusto de los alimentos. El ácido cítrico se obtiene industrialmente en cultivos del hongo *Aspergillus niger*, en presencia de una fuente barata de azúcar, normalmente melazas. Las condiciones de crecimiento se diseñan de forma que quedan inhibidas las reacciones del ciclo del ácido cítrico y se produce una acumulación de citrato.

A una escala mayor, el ácido cítrico podría algún día jugar un papel espectacular en paliar el hambre en el mundo. Gracias a sus tres grupos carboxilo cargados negativamente, el citrato es un buen quelante de iones metálicos, y algunas plantas utilizan esta propiedad liberando dicho compuesto al suelo, donde uniéndose al ión impide la absorción de éste por parte de la planta. Un caso especialmente importante es el ión aluminio (Al^{3+}), que es tóxico para un gran número de plantas y provoca un descenso de rendimiento en las cosechas de un 30% a un 40% de la tierra arable del mundo. El aluminio es el metal más abundante en la corteza terrestre, pero normalmente se encuentra como $Al(OH)_3$, un compuesto biológicamente inerte. Sin embargo, a un pH por debajo de 5, el Al^{3+} es soluble y como tal puede ser abasorbido por las raíces de las plantas. La acidificación del terreno, y la toxicidad del Al^{3+}es un hecho muy común en los trópicos, donde los campos de maíz pueden sufrir pérdidas de hasta el 80%. En México la toxicidad del Al^{3+} limita la producción de papaya a 20.000 hectáreas, cuando teóricamente se podrían cultivar hasta un total de 3 millones de hectáreas. Una solución podría ser elevar el pH del suelo con cal, pero esto es económica y ambientalmente erróneo. Una alternativa sería cultivar plantas resistentes al Al^{3+}. Existen plantas naturales con esta característica, a partir de las cuales se llega a la tercera solución, que consiste en transferir dicha resistencia y obtener plantas por medio de ingeniería genética.

Un grupo de investigadores mexicanos han obtenido gracias a estas técnicas plantas del tabaco y de la papaya que expresan elevados niveles de citrato sintasa bacteriana. Estas plantas secretan entre cinco y seis veces la cantidad normal de ácido cítrico quelador del Al^{3+} y pueden crecer incluso si el nivel de Al^{3+} en el suelo es diez veces superior al que pueden vivir las plantas control. Este nivel de resistencia permitiría a México utilizar los 3 millones de hectáreas de tierra cultivable que actualmente están en desuso por culpa del Al^{3+}.

Según las previsiones sobre el crecimiento poblacional, la producción de alimento en el mundo debería triplicarse en los próximos 50 años para poder abastecer a unos 9.600 millones de personas. Una solución a largo término consistiría en aumentar la producción agrícola en las tierras cultivables afectadas por la toxicidad del aluminio. El ácido cítrico podría jugar un papel importante en la consecución de este objetivo.

ácido cítrico opera demasiado lentamente para poder procesar el piruvato generado en la glucólisis.

La biotina de la piruvato carboxilasa transporta grupos CO_2

La reacción de la piruvato carboxilasa requiere la presencia de la vitamina **biotina (Fig. 16–16)**, que actúa como grupo prostético del enzima. La biotina juega un papel clave en muchas reacciones de carboxilación. Es un transportador especializado de grupos monocarbonados en su forma más oxidada: CO_2. (La transferencia de grupos monocarbonados en formas más reducidas la llevan a cabo otros cofactores, especialmente el tetrahidrofolato y la *S*-adenosilmetionina, tal como se describe en el Capítulo 18.) Los grupos carboxilo son activados en una reacción que consume ATP y une CO_2 a la biotina ligada al enzima. Este CO_2 "activado" se transfiere entonces a un aceptor (piruvato en este caso) en una reacción de carboxilación.

La piruvato carboxilasa se compone de cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene una molécula de biotina unida covalentemente a través de un enlace amida al grupo ε-amino de un resíduo específico Lys en el sitio activo del enzima. La carboxilación del piruvato tiene lugar en dos pasos (Fig. 16–16): primero, un grupo carboxilo procedente del HCO_3^- se une a la biotina y a continuación el grupo carboxilo se transfiere al piruvato para formar oxalacetato. Estos dos pasos tienen lugar en sitios activos diferentes; el brazo largo y flexible de la biotina transfiere grupos carboxilo activados desde el primer sitio activo (en un monómero del tetrámero) al segundo (en el monómero adyacente), actuando de un modo muy similar al del largo brazo lipoil-lisina de E_2 en el complejo de la PDH (Fig. 16–6) y al largo brazo de la porción tipo CoA de la proteína portadora de acilos que interviene en la síntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21–5); en la **Figura 16–17** se comparan estos tres brazos. Tanto el lipoato como la biotina y el pantotenato entran en las células mediante el mismo transportador; los tres se unen de manera covalente a las proteínas mediante reacciones similares y los tres proporcionan un anclaje flexible que permite que los intermedios de reacción unidos se transporten de un sitio activo a otro dentro de un complejo enzimático sin disociarse del mismo; todos participan, pues, en la canalización de sustratos.

La biotina es una vitamina necesaria en la dieta humana; es abundante en muchos alimentos y es sintetizada por bacterias intestinales. La carencia de biotina es rara, pero puede aparecer a veces cuando se consumen grandes cantidades de huevos crudos. La clara de huevo contiene una gran cantidad de la proteína **avidina** (M_r 70.000), que se une muy fuertemente a la biotina e impide su absorción por el intestino. La avidina de la clara de huevo puede actuar como un mecanismo de defensa para el embrión potencial de pollo al inhibir el crecimiento bacteriano. Cuando se hierven los huevos, la avidina se desnaturaliza (y por tanto se inactiva) junto con el resto de proteínas de la

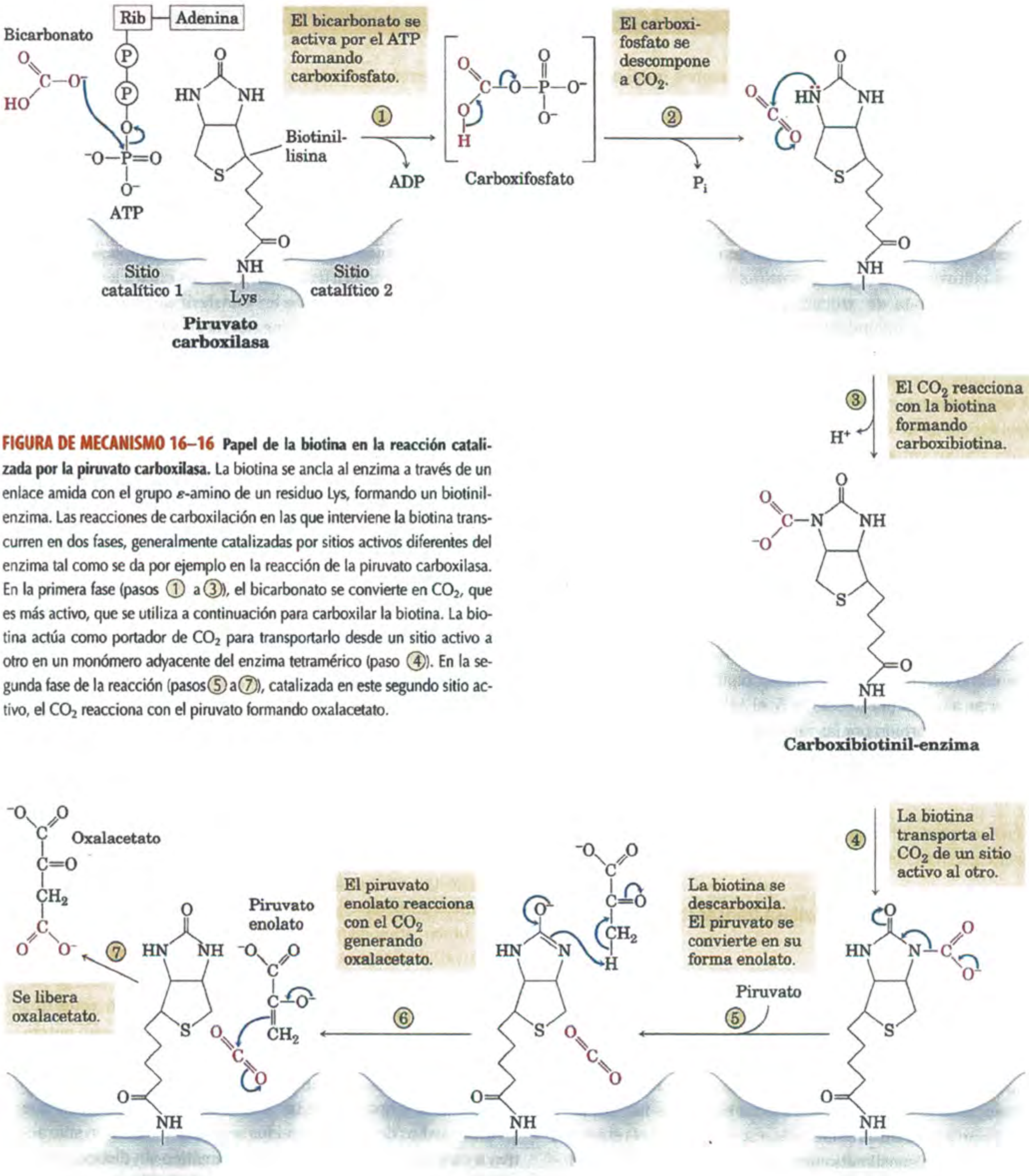


FIGURA DE MECANISMO 16–16 Papel de la biotina en la reacción catalizada por la piruvato carboxilasa. La biotina se ancla al enzima a través de un enlace amida con el grupo ε-amino de un residuo Lys, formando un biotinil-enzima. Las reacciones de carboxilación en las que interviene la biotina transcurren en dos fases, generalmente catalizadas por sitios activos diferentes del enzima tal como se da por ejemplo en la reacción de la piruvato carboxilasa. En la primera fase (pasos ① a ③), el bicarbonato se convierte en CO_2, que es más activo, que se utiliza a continuación para carboxilar la biotina. La biotina actúa como portador de CO_2 para transportarlo desde un sitio activo a otro en un monómero adyacente del enzima tetramérico (paso ④). En la segunda fase de la reacción (pasos ⑤ a ⑦), catalizada en este segundo sitio activo, el CO_2 reacciona con el piruvato formando oxalacetato.

clara de huevo. La avidina purificada es un reactivo útil en bioquímica y en biología celular. Una proteína que contenga biotina unida de forma covalente (obtenida experimentalmente o producida in vivo) puede ser recuperada mediante cromatografía de afinidad (véase la Fig. 3–17c) debido a la fuerte afinidad entre la biotina y la avidina. A continuación se eluye la proteína de la columna con un exceso de biotina libre. La elevadísima afinidad de la biotina por la avidina también se utiliza en el laboratorio en forma de adhesivo o pega molecular que puede mantener juntas dos estructuras (véase la Fig. 19-28).

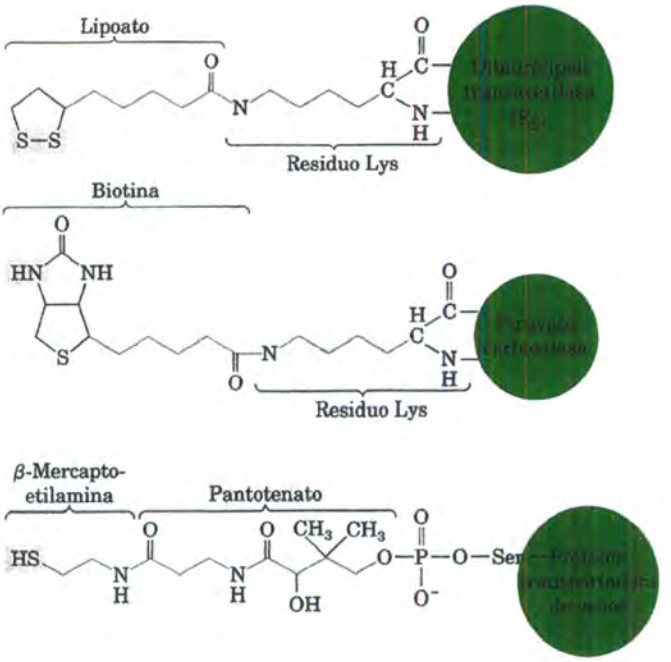


FIGURA 16–17 Ligaduras biológicas. Los cofactores lipoato, biotina y la combinación de β-mercaptoetilamina y pantotenato forman brazos largos y flexibles (azul) en los enzimas a los que están unidos de forma covalente, actuando como ligaduras que transportan intermedios de un sitio activo al siguiente. El grupo sombreado en rosa es, en cada caso, el punto de unión del intermedio activo a la ligadura.

RESUMEN 16.2 Reacciones del ciclo del ácido cítrico

- El ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs, ciclo TCA) es una ruta catabólica central casi universal en la que compuestos producidos en la degradación de glúcidos, grasas y proteínas se oxidan a CO_2 y en el que la mayor parte de la energía de oxidación se conserva temporalmente en los transportadores electrónicos $FADH_2$ y NADH. Durante el metabolismo aeróbico estos electrones se transfieren al O_2 mientras que la energía del flujo electrónico se retiene en forma de ATP.
- El acetil-CoA entra en el ciclo del ácido cítrico (en las mitocondrias de eucariotas y en el citosol de bacterias) cuando la citrato sintasa cataliza su condensación con oxalacetato para formar citrato.
- En siete reacciones secuenciales, entre las que se incluyen dos descarboxilaciones, el ciclo del ácido cítrico convierte el citrato en oxalacetato y libera dos CO_2. La ruta es cíclica, ya que no se utilizan los intermediarios del ciclo; se produce un oxalacetato por cada uno consumido.
- Por cada acetil-CoA oxidado por el ciclo del ácido cítrico, la ganancia energética consiste en tres moléculas de NADH, una de $FADH_2$ y un nucleósido trifosfato (ATP o GTP).
- Además del acetil-CoA, cualquier compuesto que produzca un intermedio del ciclo de cuatro o cinco carbonos, por ejemplo los productos de degradación de muchos aminoácidos, puede ser oxidado por el ciclo.
- El ciclo del ácido cítrico es anfibólico, ya que sirve tanto para el catabolismo como para el anabolismo; se pueden extraer intermediarios del ciclo y utilizarlos como material de partida para obtener un buen número de productos biosintéticos.
- Los intermediarios desviados del ciclo del ácido cítrico hacia otras rutas se reponen mediante varias reacciones anapleróticas, que producen intermediarios de cuatro carbonos por carboxilación de compuestos de tres carbonos; estas reacciones son catalizadas por la piruvato carboxilasa, la PEP carboxiquinasa, la PEP carboxilasa y el enzima málico. Los enzimas que catalizan carboxilaciones emplean normalmente biotina para activar el CO_2 y transportarlo a aceptores tales como el piruvato o el fosfoenolpiruvato.

16.3 Regulación del ciclo del ácido cítrico

Tal como se ha visto en el Capítulo 15, la regulación de enzimas clave de las vías metabólicas por efectores alostéricos y mediante modificación covalente asegura la producción de intermediarios a la velocidad requerida para mantener la célula en un estado estacionario estable y evita la innecesaria sobreproducción de los mismos.

El flujo de átomos de carbono desde el piruvato hacia el ciclo del ácido cítrico y a través de él está sujeto a una estrecha regulación a dos niveles: la conversión del piruvato en acetil-CoA, el material de partida del ciclo (la reacción del complejo de la piruvato deshidrogenasa) y la entrada de acetil-CoA en el ciclo (la reacción de la citrato sintasa). El acetil-CoA se produce por vías diferentes a las del complejo de la PDH (la mayor parte de células producen también acetil-CoA por oxidación de ácidos grasos y de ciertos aminoácidos), por lo que la disponibilidad de intermediarios de estas otras vías es también importante en la regulación de la oxidación del piruvato y del ciclo del ácido cítrico. El ciclo está también regulado a nivel de las reacciones de la isocitrato deshidrogenasa y de la α-cetoglutarato deshidrogenasa.

La producción de acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa está regulada por mecanismos alostéricos y covalentes

El complejo de la PDH de mamíferos es fuertemente inhibido por el ATP, así como por el acetil-CoA y el NADH, los productos de la reacción catalizada por el complejo **(Fig. 16–18)**. La inhibición alostérica de la oxidación del piruvato se incrementa enormemente cuando se hallan disponibles ácidos grasos de cadena larga. AMP, CoA y NAD^+, todos los cuales se acumulan cuando fluye demasiado poco acetil-CoA hacia el ciclo del ácido cítrico, activan alostéricamente el complejo de la PDH.

Así, esta actividad enzimática es anulada cuando se dispone de una gran cantidad de combustible en forma de ácidos grasos y de acetil-CoA y cuando las razones [ATP]/[ADP] y [NADH]/[NAD^+] de la célula son elevadas, y es activada cuando

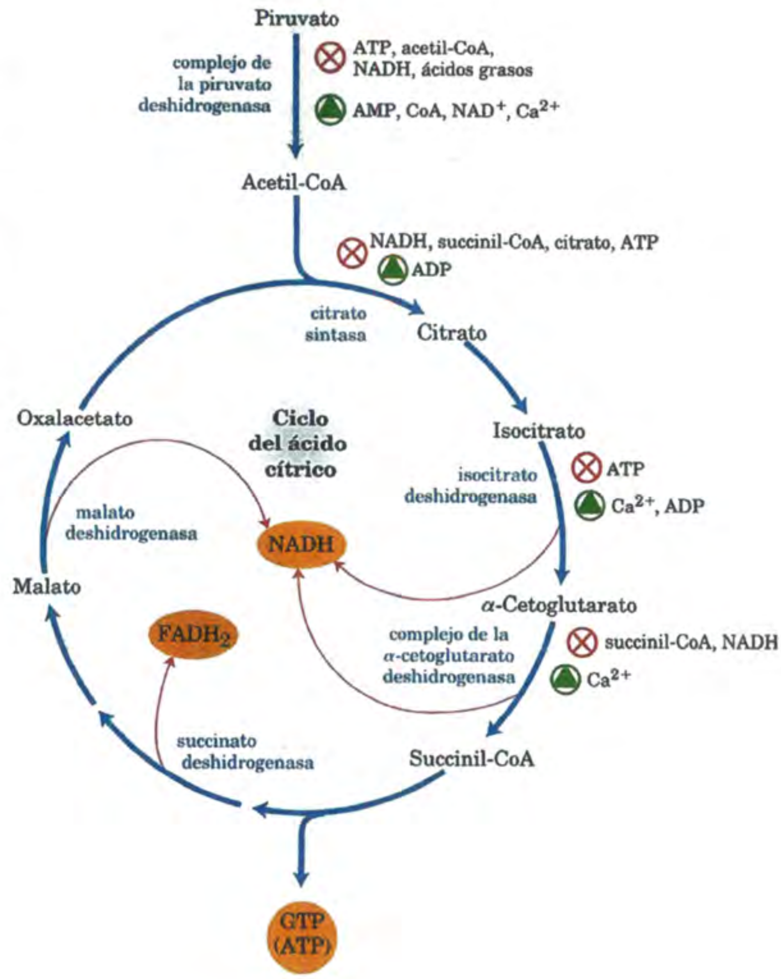


FIGURA 16–18 Regulación del flujo de metabolitos desde el complejo de la PDH a través del ciclo del ácido cítrico. El complejo de la PDH es inhibido alostéricamente cuando las relaciones [ATP]/[ADP], [NADH]/[NAD^+] y [acetil-CoA]/[CoA] son altas, lo que indica un estado metabólico energéticamente suficiente. Cuando estas relaciones disminuyen se produce una activación alostérica de la oxidación del piruvato. La velocidad de flujo a través del ciclo del ácido cítrico puede ser limitada por la disponibilidad de los sustratos de la citrato sintasa, oxalacetato y acetil-CoA, o de NAD^+, que desaparece por su conversión en NADH, con lo que se se reduce la velocidad de los tres pasos de oxidación dependientes de NAD. El ciclo también es más lento como consecuencia de la retroinhibición por el succinil-CoA, el citrato y el ATP, que inhiben en los primeros pasos. En tejido muscular, el ión Ca^{2+}es un indicador de la contracción y, tal como se muestra aquí, estimula el metabolismo productor de energía para reemplazar el ATP consumido en la contracción.

las demandas energéticas son grandes y las células necesitan un flujo mayor de acetil-CoA hacia el ciclo.

En mamíferos, estos mecanismos de regulación alostérica se complementan por un segundo nivel de regulación: la modificación covalente de proteínas. El complejo de la PDH es inhibido mediante la fosforilación reversible de un residuo Ser específico en una de las dos subunidades de E_1. Tal como se ha mencionado con anterioridad, además de los enzimas E_1, E_2 y E_3, el complejo de la PDH de mamíferos contiene dos proteínas reguladoras, cuyo único propósito es el de regular la actividad del complejo. Una proteína quinasa específica fosforila y de este modo inactiva E_1, y una fosfoproteína fosfatasa específica elimina el grupo fosforilo por hidrólisis y así activa E_1. La quinasa es activada alostéricamente por ATP: cuando la [ATP] es elevada (lo que es reflejo de un suministro de energía suficiente), el complejo de la PDH es inactivado por fosforilación de E_1. Cuando la [ATP] desciende, la actividad de la quinasa disminuye y la acción de la fosfatasa elimina los grupos fosforilo de E_1 activando el complejo.

El complejo de la PDH de plantas, localizado en la matriz mitocondrial y en los plástidos, es inhibido por sus productos NADH y acetil-CoA. El enzima mitocondrial de plantas también está regulado por fosforilación reversible; el piruvato inhibe la quinasa, activando así el complejo de la PDH, y el NH_4^+ la estimula, lo que es causa de la inhibición del complejo. El complejo de la PDH de *E. coli* está bajo regulación alostérica de modo similar al enzima de mamíferos, pero no parece estar regulado por fosforilación.

El ciclo del ácido cítrico está regulado en sus tres pasos exergónicos

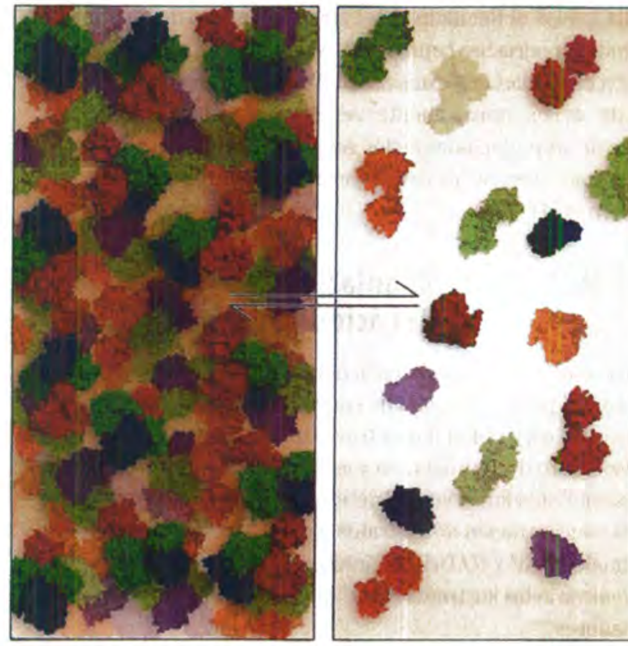
El flujo de metabolitos a través del ciclo del ácido cítrico está sometido a una regulación estricta. Tres factores gobiernan la velocidad de flujo a través del ciclo: la disponibilidad de sustratos, la inhibición por los productos acumulados y la retroinhibición alostérica de los enzimas que catalizan etapas tempranas del ciclo.

Cada una de las tres etapas altamente exergónicas en el ciclo, las catalizadas por la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α-cetoglutarato deshidrogenasa (Fig. 16–18), puede llegar a ser la etapa limitante de la velocidad bajo determinadas circunstancias. La disponibilidad de los sustratos para la citrato sintasa (acetil-CoA y oxalacetato) varía con el estado metabólico de la célula y limita en ocasiones la velocidad de formación de citrato. El NADH, un producto de la oxidación del isocitrato y el α-cetoglutarato, se acumula bajo ciertas condiciones, y a elevada [NADH]/[NAD^+] ambas reacciones de deshidrogenación resultan gravemente inhibidas por la acción de masas. De modo similar, dentro de la célula la reacción de la malato deshi-

drogenasa está esencialmente en equilibrio (es decir, está limitada por el sustrato), y cuando [NADH]/[NAD^+] es alta, la concentración de oxalacetato es baja, lo que enlentece el primer paso del ciclo. La acumulación de productos inhibe los tres pasos limitantes del ciclo: el succinil-CoA inhibe la α-cetoglutarato deshidrogenasa (y también la citrato sintasa); el citrato bloquea la citrato sintasa, y el producto final, ATP, inhibe tanto la citrato sintasa, como la isocitrato deshidrogenasa. La inhibición de la citrato sintasa por parte del ATP es mitigada por el ADP, un activador alostérico de este enzima. En el músculo de los vertebrados, el Ca^{2+}, la señal para la contracción y para el aumento concomitante en la demanda de ATP activa tanto la isocitrato deshidrogenasa como la α-cetoglutarato deshidrogenasa, así como al complejo de la PDH. En resumen, las concentraciones de sustratos y de intermediarios del ciclo del ácido cítrico hacen que el flujo a través de esta vía se mantenga a una velocidad que permite mantener concentraciones óptimas de ATP y NADH.

En condiciones normales, la velocidad de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico están integradas de manera que sólo se metaboliza a piruvato la glucosa necesaria para suministrar al ciclo del ácido cítrico su combustible, los grupos acetilo del acetil-CoA. Piruvato, lactato y acetil-CoA se mantienen a concentraciones de estado estacionario.

La velocidad de la glucólisis está adaptada a la del ciclo del ácido cítrico no sólo a través de su inhibición por niveles elevados de ATP y NADH, componentes comunes de las etapas glucolítica y respiratoria de la oxidación de la glucosa, sino también por la concentración de citrato. El citrato, producto del primer paso del ciclo del ácido cítrico, es un inhibidor alostérico importante de la fosfofructoquinasa-1 en la vía glucolítica (véase la Fig. 15-14).



En el citosol las elevadas concentraciones de los enzimas 1, 2 y 3 favorecen su asociación.

En el extracto de células rotas, la dilución por el tampón reduce las concentraciones de los enzimas 1, 2 y 3, lo que favorece su disociación.

FIGURA 16–19 La dilución de una solución que contiene un complejo proteico no covalente —como por ejemplo uno que contiene tres enzimas— favorece la disociación del complejo en sus elementos constituyentes.

En el ciclo del ácido cítrico puede darse la canalización de sustratos a través de complejos multienzimáticos

Aunque normalmente se describen los enzimas del ciclo del ácido cítrico como componentes solubles de la matriz mitocondrial (excepto la succinato deshidrogenasa que está ligado a membrana), crecen las pruebas de que dentro de la mitocondria estos enzimas existen en forma de complejos multienzimáticos. La aproximación clásica de la enzimología, purificación de proteínas individuales a partir de extractos de células rotas, se aplicó con gran éxito a los enzimas del ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, la primera víctima de la rotura celular es la organización de nivel superior dentro de la célula: la interacción no covalente reversible de una proteína con otra, o de un enzima con algún componente estructural tal como una membrana, un microtúbulo o un microfilamento. Cuando se abren las células por rotura, sus contenidos, enzimas incluidos, se diluyen de 100 a 1.000 veces **(Fig. 16–19)**.

Diversos tipos de pruebas sugieren que en las células los complejos multienzimáticos aseguran el paso eficiente del producto de una reacción enzimática al siguiente enzima de la ruta. Tales complejos se denominan **metabolones.** Se han aislado de forma conjunta varios enzimas del ciclo del ácido cítrico en forma de agregados supramoleculares o bien se han encontrado asociados con la membrana mitocondrial interna o se ha demostrado que difunden en la matriz mitocondrial más lentamente de lo que cabría esperar de la proteína individual en solución.

Existen pruebas convincentes de la canalización de sustratos a través de complejos multienzimáticos en otras rutas metabólicas y muchos enzimas que antaño se creía que eran "solubles" probablemente funcionan en la célula en forma de complejos altamente organizados que canalizan los productos intermedios. Encontraremos otros ejemplos de canalización cuando veamos la biosíntesis de aminoácidos y de nucleótidos en el Capítulo 22.

Algunas mutaciones en enzimas del ciclo del ácido cítrico producen cáncer

Cuando los mecanismos que regulan una vía tal como el ciclo del ácido cítrico son superados por una perturbación metabólica importante, el resultado puede ser una enfermedad grave. Las mutaciones en enzimas del ciclo del ácido cítrico son muy raras en los seres humanos y en otros mamíferos, pero las que tienen lugar tienen consecuencias devastadoras. Defectos genéticos en el gen de la fumarasa producen tumores del músculo liso (leiomas) y del riñón; mutaciones en la succinato deshidrogenasa producen tumores de la glándula suprarrenal (feocromocitomas). En células en cultivo con estas mutaciones, se acumulan el fumarato (en el caso de las mutaciones de la fumarasa) y, en menor grado, el succinato (en el caso de mutaciones de la succinato deshidrogenasa), acumulación que induce el factor de transcripción HIF-1α inducible por

hipoxia (véase el Recuadro 14–1). El mecanismo de formación de tumores podría ser la producción de un estado pseudohipóxico. En las células con estas mutaciones se produce una activación de genes normalmente regulados por HIF-1α. Estos efectos de las mutaciones en los genes de la fumarasa y la succinato deshidrogenasa los definen como genes supresores de tumores (p. 474). ■

RESUMEN 16.3 Regulación del ciclo del ácido cítrico

- La velocidad global del ciclo del ácido cítrico está controlada por la velocidad de conversión del piruvato a acetil-CoA y por el flujo a través de la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α-cetoglutarato deshidrogenasa. Estos flujos vienen determinados principalmente por la concentración de sustratos y productos; los productos finales, ATP y NADH, son inhibidores, mientras que por el contrario los sustratos NAD^+ y ADP actúan como estimuladores.
- La producción de acetil-CoA para el ciclo del ácido cítrico por el complejo de la PDH es inhibido alostéricamente por los metabolitos que indican una suficiencia de energía metabólica (ATP, acetil-CoA, NADH y ácidos grasos) y es estimulada por metabolitos que indican un suministro reducido de energía (AMP, NAD^+, CoA).
- Los complejos de enzimas consecutivos de una ruta permiten la canalización de sustratos a través de los mismos.

16.4 El ciclo del glioxilato

Los vertebrados no pueden convertir los ácidos grasos o el acetato derivado de ellos a glúcidos. La conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato (p. 538) y de piruvato en acetil-CoA (Fig. 16–2) son tan exergónicas que son esencialmente irreversibles.

Si una célula no puede convertir acetato en fosfoenolpiruvato, el acetato no puede servir de material de partida para la vía gluconeogénica, que lleva de fosfoenolpiruvato a glucosa (véase la Fig. 15-11). Sin esta capacidad, una célula o un organismo no son capaces de convertir combustibles o metabolitos que son degradados a acetato (ácidos grasos y ciertos aminoácidos) en glúcidos.

Como vimos en nuestra discusión de las reacciones anapleróticas (Tabla 16-2), el fosfoenolpiruvato se puede sintetizar a partir de oxalacetato mediante la reacción reversible catalizada por la PEP carboxiquinasa:

$$\text{Oxalacetato} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{fosfoenolpiruvato} + CO_2 + \text{GDP}$$

Dado que los átomos de carbono de las moléculas de acetato que entran en el ciclo del ácido cítrico aparecen ocho pasos más tarde en el oxalacetato, podría parecer que esta vía podría generar oxalacetato a partir de acetato, y así generar fosfoenolpiruvato para la gluconeogénesis. Sin embargo, un examen de la estequiometría del ciclo del ácido cítrico muestra que no hay conversión *neta* de acetato a oxalacetato; en los vertebrados, por cada dos carbonos que entran en el ciclo en forma de acetil-CoA, salen dos en forma de CO_2. En muchos organismos no vertebrados, el ciclo del glioxilato sirve como mecanismo para convertir acetato en glúcido.

El ciclo del glioxilato produce compuestos de cuatro carbonos a partir de acetato

En plantas, ciertos invertebrados y algunos microorganismos (incluidos bacterias como *Escherichia coli* y levaduras), el acetato puede servir como combustible altamente energético y también como fuente de fosfoenolpiruvato para la síntesis de glúcidos. En estos organismos, enzimas del **ciclo del glioxilato** catalizan la conversión neta de acetato en succinato o en otro intermediario de cuatro átomos de carbono del ciclo del ácido cítrico:

$$2\ \text{Acetil-CoA} + NAD^+ + 2H_2O \longrightarrow \text{succinato} + 2\text{CoA} + \text{NADH} + H^+$$

En el ciclo del glioxilato, el acetil-CoA se condensa con el oxalacetato para formar citrato y el citrato se convierte en isocitrato, exactamente igual que en el ciclo del ácido cítrico. El siguiente paso, sin embargo, no consiste en la degradación del isocitrato por la isocitrato deshidrogenasa, sino en la rotura de isocitrato por la **isocitrato liasa,** formando succinato y **glioxilato.**

El glioxilato se condensa entonces con una segunda molécula de acetil-CoA para dar malato en una reacción catalizada por la **malato sintasa.** El malato se oxida posteriormente a oxalacetato, el cual puede condensarse con otra molécula de acetil-CoA para empezar otra vuelta del ciclo **(Fig. 16–20).** Cada vuelta del ciclo del glioxilato consume dos moléculas de acetil-CoA y produce una molécula de succinato, disponible para fines biosintéticos. El succinato puede convertirse a través de fumarato y malato en oxalacetato, el cual puede convertirse en fosfoenolpiruvato por la PEP carboxiquinasa, y así hasta glucosa por la gluconeogénesis. Los vertebrados no poseen los enzimas específicos del ciclo del glioxilato (isocitrato liasa y malato sintasa) y, por tanto, no pueden producir síntesis neta de glucosa a partir de lípidos.

En plantas, los enzimas del ciclo del glioxilato se encuentran secuestrados en orgánulos unidos a membrana denominados glioxisomas, que son peroxisomas especializados **(Fig. 16–21)**. Los enzimas comunes a los ciclos del ácido cítrico y del glioxilato tienen dos isozimas, uno específico de mitocondrias y el otro de glioxisomas. Los glioxisomas no están presentes en todos los tejidos de las plantas siempre. Se desarrollan en semillas ricas en lípidos durante la germinación, antes de que las plantas en desarrollo adquieran la capacidad de sintetizar glucosa por la fotosíntesis. Además de los enzimas del ciclo del glioxilato, los glioxisomas contienen todos los enzimas necesarios para la degradación de los ácidos grasos almacenados en los aceites de las semillas (véase la Fig 17–13). El acetil-CoA formado a partir de la degradación de lípidos se convierte en succinato vía el ciclo del glioxilato, y el succinato se exporta a la mitocondria, en donde los enzimas del ciclo del ácido cítrico lo transforman en malato. Un isozima citosólico de la malato deshidrogenasa oxida malato a oxalacetato, un precursor de la gluconeogénesis. Las semillas en germinación pueden, por tanto, convertir el carbono de los lípidos almacenados en glucosa.

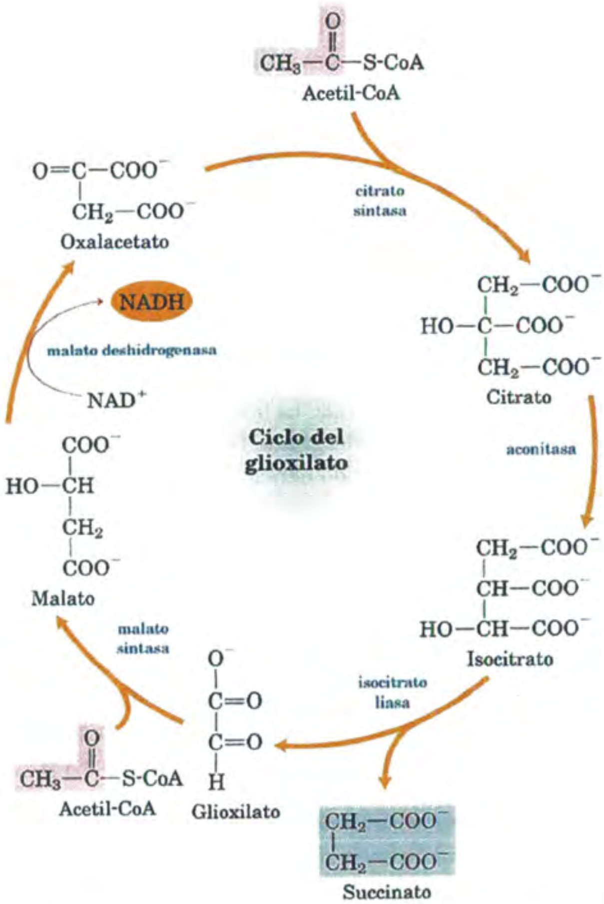


FIGURA 16–20 Ciclo del glioxilato. La citrato sintasa, la aconitasa y la malato deshidrogenasa del ciclo del glioxilato son isozimas de los enzimas del ciclo del ácido cítrico; la isocitrato liasa y la malato sintasa son únicas del ciclo del glioxilato. Observe que entran dos grupos acetilo (rosa) en el ciclo y que salen cuatro átomos de carbono en forma de succinato (azul). El ciclo del glioxilato fue elucidado por Hans Kornberg y Neil Madsen en el laboratorio de Hans Krebs.

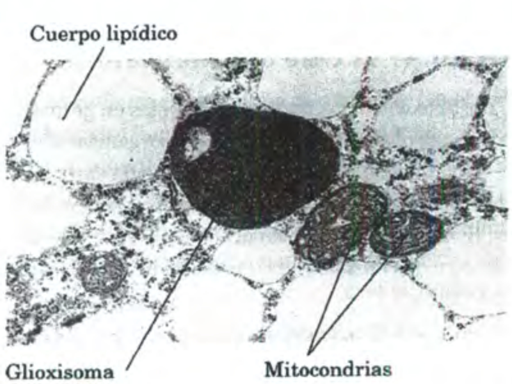


FIGURA 16–21 Micrografía electrónica de una semilla de pepino en germinación, mostrando un glioxisoma, mitocondrias y los cuerpos lipídicos que los rodean.

Los ciclos del ácido cítrico y del glioxilato tienen una regulación coordinada

En las semillas en germinación, las transformaciones enzimáticas de los ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos se producen en tres compartimientos intracelulares: mitocondrias, glioxisomas y citosol. Existe un intercambio continuo de metabolitos entre estos compartimientos (**Fig. 16–22**).

El esqueleto carbonado del oxalacetato del ciclo del ácido cítrico (en la mitocondria) es transportado al glioxisoma en forma de aspartato. El aspartato se convierte en oxalacetato, que se condensa con el acetil-CoA procedente de la degradación de ácidos grasos. El citrato así formado se convierte en isocitrato por la aconitasa, y entonces se escinde en glioxilato y succinato por la isocitrato liasa. El succinato regresa a la mitocondria, donde vuelve a entrar en el ciclo del ácido cítrico y se transfor-

Importante

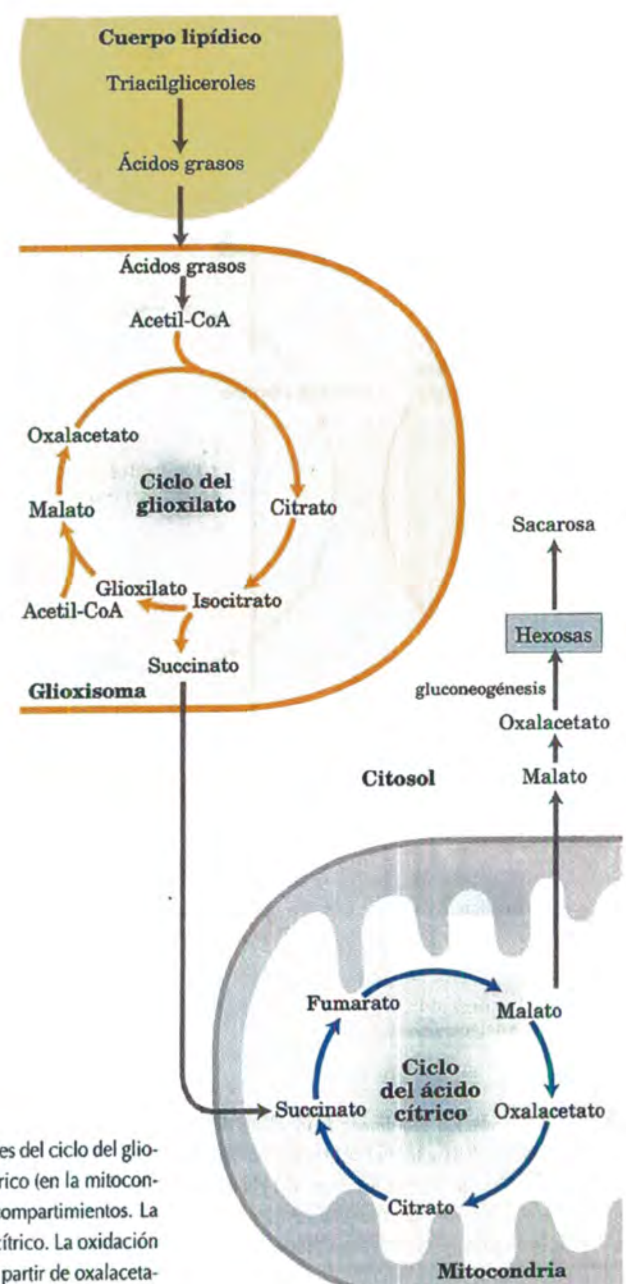


FIGURA 16–22 Relación entre los ciclos del glioxilato y del ácido cítrico. Las reacciones del ciclo del glioxilato (en los glioxisomas) tienen lugar simultáneamente con las del ciclo del ácido cítrico (en la mitocondria), engranándose con ellas cuando los productos intermedios pasan entre ambos compartimientos. La conversión del succinato en oxalacetato es catalizada por enzimas del ciclo del ácido cítrico. La oxidación de los ácidos grasos a acetil-CoA se describe en el Capítulo 17; la síntesis de hexosas a partir de oxalacetato se describe en el Capítulo 20.

ma en malato, que entra en el citosol y es oxidado (por acción de la malato deshidrogenasa citosólica) a oxalacetato. El oxalacetato se convierte vía gluconeogénesis en hexosas y sacarosa, las cuales pueden ser transportadas a las raíces y tallo en crecimiento. En estas conversiones participan cuatro vías diferentes: la degradación de ácidos grasos a acetil-CoA (en los glioxisomas), el ciclo del glioxilato (que tiene lugar en los glioxisomas), el ciclo del ácido cítrico (en las mitocondrias) y la gluconeogénesis (en el citosol).

El hecho de compartir intermediarios comunes requiere que estas vías estén reguladas coordinadamente. El isocitrato es un intermediario crucial, en el punto de ramificación entre los ciclos del glioxilato y del ácido cítrico **(Fig. 16–23)**. La isocitrato deshidrogenasa se encuentra regulada mediante modificación covalente: una proteína quinasa específica la fosforila, con lo que se inactiva la deshidrogenasa. Esta inactivación desvía el isocitrato hacia el ciclo del glioxilato, donde inicia su ruta sintética hacia glucosa. Una fosfoproteína fosfatasa elimina el grupo fosforilo de la isocitrato deshidrogenasa, reactivando el enzima y enviando más isocitrato a través del ciclo del ácido cítrico generador de energía. La proteína quinasa reguladora y la fosfoproteína fosfatasa son actividades enzimáticas diferentes en una única cadena polipeptídica.

FIGURA 16–23 Regulación coordinada de los ciclos del glioxilato y del ácido cítrico. La regulación de la actividad de la isocitrato deshidrogenasa determina la distribución del isocitrato entre los ciclos del glioxilato y del ácido cítrico. Cuando se inactiva el enzima por fosforilación (por una proteína quinasa específica), el isocitrato se dirige a reacciones biosintéticas vía ciclo del glioxilato. Cuando el enzima se activa por desfosforilación (por una fosfatasa específica), el isocitrato entra en el ciclo del ácido cítrico y se produce ATP.

Algunas bacterias, como es el caso de *E. coli*, poseen toda la dotación de enzimas de los ciclos del glioxilato y del ácido cítrico en su citosol y pueden, por tanto, crecer con acetato como única fuente de carbono y energía. La fosfoproteína fosfatasa que activa la isocitrato deshidrogenasa está estimulada por intermediarios del ciclo del ácido cítrico y de la glucólisis, y por indicadores de un reducido aporte energético celular (Fig. 16–23). Los mismos metabolitos *inhiben* la actividad proteína quinasa del polipéptido bifuncional. De este modo, la acumulación de intermediarios de las vías centrales de generación de energía, que indican una reducción energética, dan como resultado la activación de la isocitrato deshidrogenasa. Cuando disminuye la concentración de estos reguladores, hecho que indica un flujo suficiente a través del ciclo del ácido cítrico generador de energía, la isocitrato deshidrogenasa es inactivada por la proteína quinasa.

Los mismos intermediarios de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico que activan la isocitrato deshidrogenasa son inhibidores alostéricos de la isocitrato liasa. Cuando el metabolismo productor de energía es lo suficientemente rápido como para mantener las concentraciones de los intermediarios de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico a un nivel bajo, la isocitrato deshidrogenasa se inactiva, desaparece la inhibición de la isocitrato liasa y el isocitrato fluye hacia el ciclo del glioxilato, para ser utilizado en la biosíntesis de glúcidos, aminoácidos y otros componentes celulares.

RESUMEN 16.4 El ciclo del glioxilato

- El ciclo del glioxilato es activo en las semillas en germinación de algunas plantas y en ciertos microorganismos que pueden vivir con acetato como única fuente de carbono. En las plantas esta vía tiene lugar en los glioxisomas de las semillas. Están implicados diversos enzimas del ciclo del ácido cítrico y dos enzimas adicionales: la isocitrato liasa y la malato sintasa.
- Debido a que el ciclo del glioxilato evita las dos etapas descarboxilativas del ciclo del ácido cítrico, es posible la formación *neta* de succinato, oxalacetato y otros intermediarios del ciclo a partir de acetil-CoA. El oxalacetato así formado puede usarse para la síntesis de glucosa vía gluconeogénesis.
- Los vertebrados carecen del ciclo del glioxilato y no pueden sintetizar glucosa a partir de acetato o de ácidos grasos que forman acetil-CoA.
- La distribución de isocitrato entre el ciclo del ácido cítrico y el ciclo del glioxilato está controlado a nivel de la isocitrato deshidrogenasa. Este enzima está sujeto a regulación por fosforilación reversible.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

respiración 615
respiración celular 615
ciclo del ácido cítrico 615
ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) 615
ciclo de Krebs 615
complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) 616
descarboxilación oxidativa 616
tioéster 617
lipoato 617
canalización de sustratos 619
centro ferro-sulfurado 623
complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa 625
nucleósido difosfato quinasa 627
sintasas 627
sintetasas 627
ligasas 627
liasas 627
quinasas 627
fosforilasas 627
fosfatasas 627
molécula proquiral 629
ruta anfibólica 631
reacción anaplerótica 631
biotina 633
avidina 633
metabolón 637
ciclo del glioxilato 638

Bibliografía

General

Holmes, F.L. (1990, 1993) *Hans Krebs*, Vol 1: *Formation of a Scientific Life, 1900–1933*; Vol. 2: *Architect of Intermediary Metabolism, 1933–1937*, Oxford University Press, Oxford.
Una biografía científica y personal de Krebs, con una descripción exhaustiva del trabajo que desveló los ciclos de la urea y del ácido cítrico.

Kay, J. & Weitzman, P.D.J. (eds). (1987) *Krebs' Citric Acid Cycle: Half a Century and Still Turning*, Biochemical Society Symposium **54**, The Biochemical Society, London.
Un libro de varios autores sobre el ciclo del ácido cítrico, que incluye genética molecular, mecanismos de regulación, variaciones en el ciclo de microorganismos de nichos ecológicos inusuales y evolución de la vía. Especialmente pertinentes son los capítulos de H. Gest. (Evolutionay Roots of the Citric Acid Cycle in Prokaryotes), W.H. Holms (Control of Flux through the Citric Acid Cycle and the Glyoxylate Bypass in *Escherichia coli*), y R.N. Perham et al. (α-Keto Acid Dehydrogenase Complexes).

Complejo piruvato deshidrogenasa

Harris, R.A., Bowker-Kinley, M.M., Huang, B., & Wu, P. (2002) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv. Enzyme Regul.* **42**, 249–259.

Milne, J.L.S., Shi, D., Rosenthal, P.B., Sunshine, J.S., Domingo, G.J., Wu, X., Brooks, B.R., Perham, R.N., Henderson, R., & Subramaniam, S. (2002) Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine. *EMBO J.* **21**, 5587–5598.
Bella ilustración del poder de la metodología de reconstrucción de imágenes con microscopia crioelectrónica utilizada aquí para desarrollar un modelo plausible de la estructura del complejo de la PDH. Compare este modelo con el del artículo de Zhou et al. (más adelante).

Perham, R.N. (2000) Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 961–1004.
Revisión del papel de los brazos basculantes que contienen lipoato, biotina y pantotenato en la canalización de sustratos a través de complejos multienzimáticos.

Zhou, Z.H., McCarthy, D.B., O'Conner, C.M., Reed, L.J., & Stoops, J.K. (2001) The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14,802–14,807.
Otra artículo impresionante en el que la reconstrucción de imágenes con microscopia crioelectrónica proporciona un modelo del complejo de la PDH. Compare este modelo con el del artículo de Milne et al. (arriba).

Enzimas del ciclo del ácido cítrico

Fraser, M.D., James, M.N., Bridger, W.A., & Wolodko, W.T. (1999) A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *J. Mol. Biol.* **285**, 1633–1653. (véase también la errata en *J. Mol. Biol.* **288**, 501 (1999).)

Goward, C.R. & Nicholls, D.J. (1994) Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci.* **3**, 1883–1888.
Una buena y breve revisión.

Hagerhall, C. (1997) Succinate:quinone oxidoreductases: variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 107–141.
Una revisión de la estructura y función de las succinato deshidrogenasas.

Jitrapakdee, S. & Wallace, J.C. (1999) Structure, function, and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **340**, 1–16.

Knowles, J. (1989) The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 195–221.

Matte, A., Tari, L.W., Goldie, H., & Delbaere, L.T.J. (1997) Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 8105–8108.

Ovadi, J. & Srere, P. (2000) Macromolecular compartmentation and channeling. *Int. Rev. Cytol.* **192**, 255–280.
Revisión avanzada sobre las pruebas de canalización de sustratos y metabolones.

Remington, S.J. (1992) Structure and mechanism of citrate synthase. *Curr. Top. Cell. Regul.* **33**, 209–229.
Una revisión extensa sobre este enzima.

Singer, T.P. & Johnson, M.K. (1985) The prosthetic groups of succinate dehydrogenase: 30 years from discovery to identification. *FEBS Lett.* **190**, 189–198.
Una descripción de la estructura y del papel de los centros ferro-sulfurados en este enzima.

Wolodko, W.T., Fraser, M.E., James, M.N.G., & Bridger, W.A. (1994) The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **269**, 10,883–10,890.

Enzimas con doble actividad ("moonlighting")

Eisenstein, R.S. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 627–662.

Jeffery, C.J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8-11.
El autor introduce el término "claro de luna" para las proteínas multifuncionales.

Kim, J.-W. & Dang, C.V. (2006) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 142–150.
Revisión a nivel intermedio sobre enzimas con doble actividad.

Rouault, T.A. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 406–414.
Revisión de nivel avanzado.

Regulación del ciclo del ácido ciclo

Briere, J.-J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Rustin, P. (2006) Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, 1114–1120.

Revisión de nivel intermedio sobre los efectos clínicos de las mutaciones en la succinato deshidrogenasa, fumarasa y α-cetoglutarato deshidrogenasa.

Hansford, R.G. (1980) Control of mitochondrial substrate oxidation. *Curr. Top. Bioenerget.* **10**, 217–278.
Revisión detallada de la regulación del ciclo del ácido cítrico.

Kaplan, N.O. (1985) The role of pyridine nucleotides in regulating cellular metabolism. *Curr. Top. Cell. Regul.* **26**, 371–381.
Una discusión general excelente de la importancia de la relación [NADH]/[NAD$^+$] en la regulación celular.

King, A., Selak, M.A., & Gottlieb, E. (2006) Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* **25**, 4675–4682.

Reed, L.J., Damuni, Z., & Merryfield, M.L. (1985) Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain α-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr. Top. Cell. Regul.* **27**, 41–49.

Ciclo del glioxilato

Eastmond, P.J. & Graham, I.A. (2001) Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* **6**, 72–77.
Revisión de nivel intermedio sobre los estudios del ciclo del glioxilato en *Arabidopsis*.

Holms, W.H. (1986) The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.* **28**, 69–106.

Problemas

1. Balance del ciclo del ácido cítrico El ciclo del ácido cítrico contiene ocho enzimas: citrato sintasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, α-cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa.

(a) Escriba una ecuación igualada para la reacción que cataliza cada enzima.

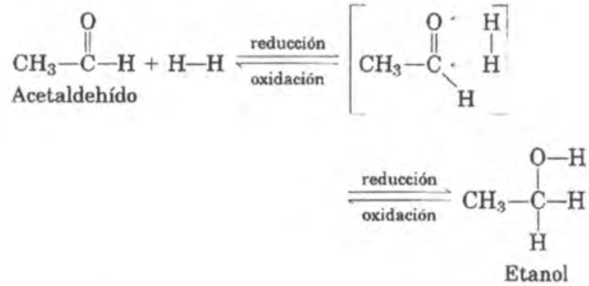
(b) Nombre el cofactor o cofactores requeridos para cada reacción.

(c) Para cada enzima determine cuál de los siguientes describe el tipo de la reacción(es) que cataliza: condensación (formación de enlaces carbono-carbono); deshidratación (pérdida de agua); hidratación (adición de agua); descarboxilación (pérdida de CO_2); oxidación-reducción; fosforilación a nivel de sustrato; isomerización.

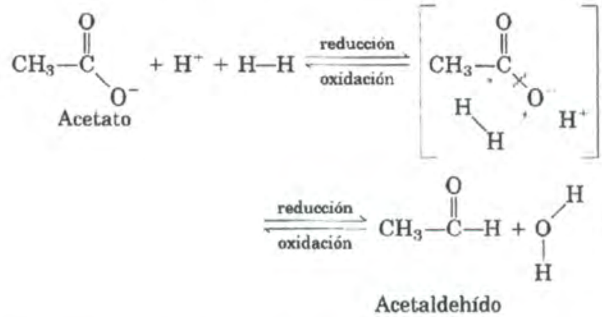
(d) Escriba una ecuación neta igualada para el catabolismo de acetil-CoA a CO_2.

2. Ecuación neta de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico Escriba la ecuación bioquímica neta para el metabolismo de una molécula de glucosa por la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, incluyendo todos los cofactores.

3. Identificación de reacciones de oxidación y de reducción Una estrategia bioquímica de muchos organismos vivos consiste en la oxidación secuencial de compuestos orgánicos a CO_2 y H_2O y en la conservación de la mayor parte de la energía así producida en forma de ATP. Es importante ser capaz de reconocer procesos de oxidación-reducción en el metabolismo. La reducción de una molécula orgánica se obtiene a partir de la hidrogenación de un doble enlace (Ecuación 1, columna de la derecha) o de un enlace sencillo acompañada por una ruptura molecular (Ecuación 2). Inversamente, la oxidación tiene lugar como consecuencia de una deshidrogenación. En las reacciones redox bioquímicas, los coenzimas NAD y FAD deshidrogenan o hidrogenan moléculas orgánicas en presencia de los enzimas correspondientes.

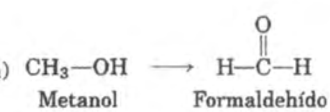


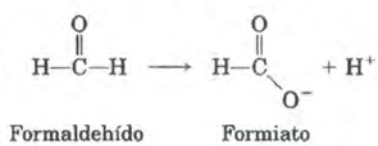
(1)

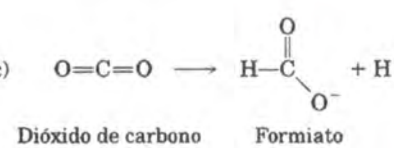


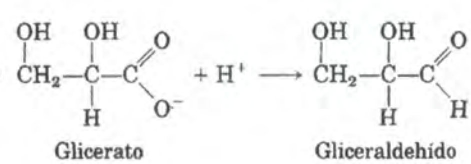
(2)

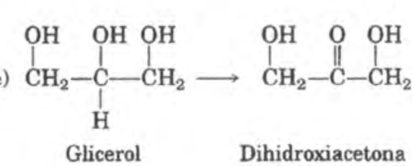
Para cada una de las transformaciones metabólicas que van desde (a) hasta (h), determine si se ha producido una oxidación o bien una reducción. Iguale cada transformación insertando H—H y, donde sea necesario, H_2O.

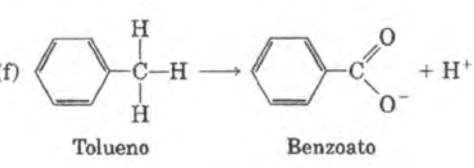
(a) 

(b) 

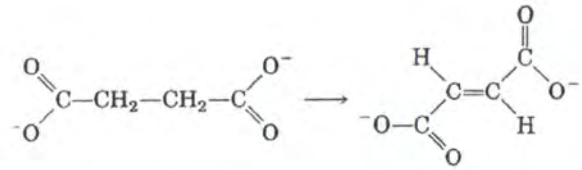
(c) 

(d) 

(e) 

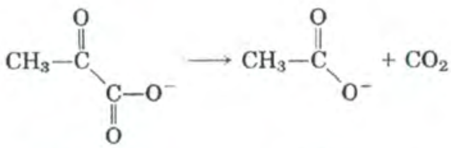
(f) 

(g)



Succinato → Fumarato

(h)



Piruvato → Acetato

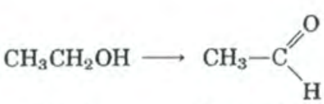
4. Relación entre energía liberada y estado de oxidación del carbono Una célula eucariótica puede utilizar glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y ácido hexanoico ($C_6H_{14}O_2$) como carburantes para la respiración celular. Basándose en sus fórmulas estructurales, ¿qué sustrato liberará más energía después de una combustión completa a CO_2 y H_2O?

5. Coenzimas de nicotinamida como transportadores redox reversibles Los coenzimas de nicotinamida (véase la Fig. 13–24) pueden experimentar reacciones de oxidación-reducción reversibles con sustratos específicos en presencia de la deshidrogenasa apropiada. En estas reacciones, NADH + H^+ actúan como fuente de hidrógeno, tal como se describe en el problema 3. Siempre que el coenzima es oxidado, un sustrato debe ser simultáneamente reducido:

$$\underset{\text{Oxidado}}{\text{Sustrato}} + \underset{\text{Reducido}}{\text{NADH}} + H^+ \rightleftharpoons \underset{\text{Reducido}}{\text{producto}} + \underset{\text{Oxidado}}{\text{NAD}^+}$$

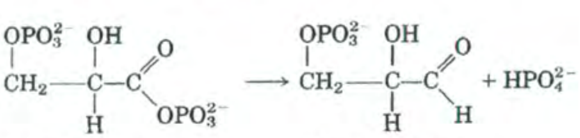
Para cada una de las reacciones desde (a) hasta (f), determine si el sustrato ha sido oxidado o reducido o si no ha habido cambio en su estado de oxidación (véase el Problema 3). Si ha ocurrido un cambio redox, iguale la reacción con la cantidad necesaria de NAD^+, NADH, H^+ y H_2O. El objetivo es reconocer cuando un coenzima redox es necesario en una reacción metabólica.

(a)



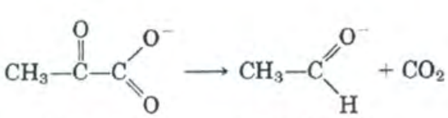
Etanol → Acetaldehído

(b)



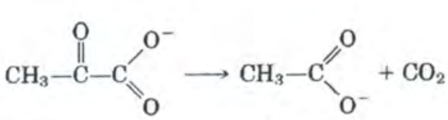
1,3-Bisfosfoglicerato → Gliceraldehído 3-fosfato

(c)



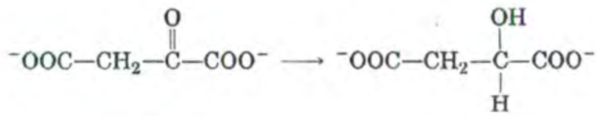
Piruvato → Acetaldehído

(d)



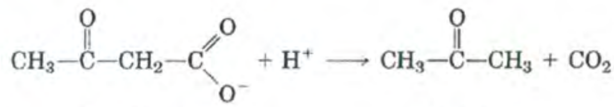
Piruvato → Acetato

(e)



Oxalacetato → Malato

(f)



Acetoacetato → Acetona

6. Cofactores y mecanismo de la piruvato deshidrogenasa Describa el papel desempeñado por cada cofactor que interviene en la reacción catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa.

7. Carencia de tiamina Los individuos con carencia de tiamina en la dieta tienen concentraciones elevadas de piruvato en la sangre. Explique este hecho en términos bioquímicos.

8. Reacción de la isocitrato deshidrogenasa ¿Qué tipo de reacción química está implicado en la conversión del isocitrato en α-cetoglutarato? Nombre y describa el papel de los cofactores. ¿Qué otra reacción o reacciones del ciclo del ácido cítrico son del mismo tipo?

9. Estimulación del consumo de oxígeno por oxalacetato y malato A principios de la década de 1930, Albert Szent-Györgyi expuso la interesante observación de que la adición de pequeñas cantidades de oxalacetato o de malato a suspensiones de músculo de pecho de paloma desmenuzado estimulaba el consumo de oxígeno de la preparación. Sorprendentemente, la cantidad de oxígeno consumida era unas siete veces mayor que la cantidad necesaria para la oxidación completa (a CO_2 y H_2O) del oxalacetato o malato añadido. ¿Por qué la adición de oxalacetato o malato estimulaba el consumo de oxígeno? ¿Por qué era la cantidad de oxígeno consumida mucho mayor que la cantidad necesaria para oxidar completamente el oxalacetato o el malato añadido?

10. Formación de oxalacetato en la mitocondria En la última reacción del ciclo del ácido cítrico, el malato se deshidrogena para regenerar el oxalacetato necesario para la entrada del acetil-CoA en el ciclo:

$$\text{L-Malato} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{NADH} + H^+ \qquad \Delta G'^\circ = 30{,}0 \text{ kJ/mol}$$

(a) Calcule la constante de equilibrio para esta reacción a 25 °C.

(b) Debido a que $\Delta G'^\circ$ supone un pH estándar de 7, la constante de equilibrio calculada en (a) corresponde a

$$K'_{eq} = \frac{[\text{oxalacetato}][\text{NADH}]}{[\text{L-malato}][\text{NAD}^+]}$$

La concentración de L-malato medida en la mitocondria de hígado de rata es de unos 0,20 mM cuando $[NAD^+]/[NADH]$ es 10. Calcule la concentración de oxalacetato a pH 7 en estas mitocondrias.

(c) Para apreciar la magnitud de la concentración de oxalacetato mitocondrial, calcule el número de moléculas de oxalacetato existentes en una única mitocondria de hígado de rata. Suponga que la mitocondria es una esfera, con un diámetro de unos 2,0 μm.

11. Cofactores para el ciclo del ácido cítrico Suponga que ha preparado un extrato mitocondrial que contiene todos los enzimas solubles de la matriz pero que ha perdido (por diálisis) todos los cofatores de baja masa molecular. ¿Qué habrá de añadir al extracto de manera que la preparación pueda oxidar el acetil-CoA a CO_2?

12. Carencia de riboflavina ¿De qué modo podría afectar al funcionamiento del ciclo del ácido cítrico una carencia de riboflavina? Justifique su respuesta.

13. Reserva de oxalacetato ¿Qué factores podrían disminuir la reserva de oxalacetato disponible para la actividad del ciclo del ácido cítrico? ¿Cómo se puede reponer la reserva de oxalacetato?

14. Energía que se obtiene a partir del ciclo del ácido cítrico La reacción catalizada por la succinil-CoA sintetasa produce el compuesto de elevada energía GTP. ¿Cómo se incorpora la energía libre contenida en el GTP en el contenido celular de ATP?

15. Estudios de la respiración en mitocondrias aisladas La respiración celular se puede estudiar en mitocondrias aisladas midiendo el consumo de oxígeno en diferentes condiciones. Si se añade 0,01 M de malonato sódico a mitocondrias que respiran activamente y que utilizan piruvato como combustible, la respiración pronto se para y se acumula un intermediario metabólico.

(a) ¿Cuál es la estructura de este intermediario?
(b) Explique por qué se acumula.
(c) Explique por qué se para el consumo de oxígeno.
(d) Aparte de eliminar el malonato, ¿cómo se podría superar esta inhibición de la respiración? Explíquelo.

16. Estudios de marcaje en mitocondrias aisladas Las vías metabólicas de los compuestos orgánicos se han obtenido a menudo utilizando sustratos marcados radiactivamente y siguiendo el destino final de los átomos que han sido previamente marcados marcados.

(a) ¿Cómo podría determinar si la glucosa añadida a una suspensión de mitocondrias aisladas se metaboliza a CO_2 y H_2O?

(b) Suponga que añade un breve pulso de [3-^{14}C]piruvato (marcado en la posición metilo) a las mitocondrias. Después de consumir una vuelta del ciclo del ácido cítrico, ¿cuál será la posición que ocupa ^{14}C en el oxalacetato? Explíquelo siguiendo el ^{14}C a través de la vía. ¿Cuántas vueltas del ciclo serán necesarias para conseguir liberar todo el [3-^{14}C]piruvato en forma de CO_2?

17. Ruta del CO_2 en la gluconeogénesis En el primer paso de rodeo de la gluconeogénesis, conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato (PEP), el piruvato se carboxila por la piruvato carboxilasa a oxalacetato, que a continuación se descarboxila a PEP por la PEP carboxiquinasa (Capítulo 14). Debido a que a la adición de CO_2 le sigue una pérdida de CO_2, podría esperarse que en experimentos de seguimiento, el ^{14}C del $^{14}CO_2$ no se incorporaría ni al PEP, ni a la glucosa ni a cualquiera de los intermediarios de la gluconeogénesis. No obstante, se encontró que cuando una preparación de hígado de rata sintetiza glucosa en presencia de $^{14}CO_2$, aparece lentamente ^{14}C en el PEP y finalmente en C-3 y C-4 de la glucosa. ¿Cómo entre el ^{14}C en el PEP y en la glucosa? (Pista: Durante la gluconeogénesis en presencia de $^{14}CO_2$ también se marcan diversos intermediarios de cuatro carbonos del ciclos del ácido cítrico.)

18. Catabolismo de [1-^{14}C]glucosa Un cultivo bacteriano que respira activamente se incuba brevemente con [1-^{14}C]glucosa, y se aislan los intermediarios glucolíticos y del ciclo del ácido cítrico. ¿Dónde se halla el ^{14}C en cada uno de los intermediarios indicados a continuación? Considere sólo la incorporación inicial de ^{14}C, en el primer paso de la glucosa marcada a través de las vías.

(a) Fructosa 1,6-bisfosfato
(b) Gliceraldehído 3-fosfato
(c) Fosfoenolpiruvato
(d) Acetil-CoA
(e) Citrato
(f) α-Cetoglutarato
(g) Oxalacetato

19. Papel de la vitamina tiamina Las personas que padecen beriberi, una enfermedad causada por la carencia de tiamina, presentan elevados niveles de piruvato y α-cetoglutarato en sangre, especialmente después de consumir una comida rica en glucosa. ¿Cómo se relacionan estos efectos con la deficiencia de tiamina?

20. Síntesis de oxalacetato por el ciclo del ácido cítrico El oxalacetato se forma en el último paso del ciclo del ácido cítrico por la oxidación de L-malato dependiente de NAD^+. ¿Puede tener lugar una síntesis neta de oxalacetato a partir de acetil-CoA utilizando únicamente los enzimas y cofactores del ciclo del ácido cítrico sin eliminar los intermediarios del ciclo? Explíquelo. ¿Cómo se recupera el oxalacetato perdido en el ciclo (dirigido hacia reacciones biosintéticas)?

21. Eliminación del oxalacetato El hígado de mamíferos puede llevar a cabo la gluconeogénesis utilizando oxalacetato como material de partida (Capítulo 14). ¿Quedaría afectado el funcionamiento del ciclo del ácido cítrico si se utilizase profusamente el oxalacetato para la gluconeogénesis? Justifique su respuesta.

22. Modo de acción del rodenticida fluoroacetato El fluoroacetato, preparado comercialmente para el control de roedores es también producido por una planta en África del Sur. Después de entrar en la célula, el fluoroacetato se conviere en fluoroacetil-CoA en una reacción catalizada por el enzima acetato tioquinasa:

$$F{-}CH_2COO^- + \text{CoA-SH} + \text{ATP} \longrightarrow F{-}CH_2\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}\text{S-CoA} + \text{AMP} + PP_i$$

El efecto tóxico del fluoroacetato se estudió en un experimento utilizando corazón aislado de rata intacto. Después de la perfusión del corazón con fluoroacetato 0,22 mM, disminuyeron la tasa de captación de glucosa y la glucólisis al tiempo que se acumulaban la glucosa 6-fosfato y la fructosa 6-fosfato. Un examen de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico reveló que sus concentraciones se hallaban por debajo de lo normal, excepto para el citrato, con una concentración 10 veces superior a la normal.

(a) ¿Dónde tuvo lugar el bloqueo del ciclo del ácido cítrico? ¿Qué produjo la acumulación del citrato y la disminución de los otros intermediarios del ciclo?

(b) El fluoroacetil-CoA se transforma enzimáticamente en el ciclo del ácido cítrico. ¿Cuál es la estructura del producto final del metabolismo del fluoroacetato? ¿Por qué bloquea el ciclo del ácido cítrico? ¿Cómo se podría superar esta inhibición?

(c) En los experimentos de perfusión del corazón, ¿por qué disminuyeron la captación de glucosa y la glucólisis? ¿Por qué se acumularon hexosas monofosfato?

(d) ¿Por qué el envenenamiento con fluoroacetato es letal?

23. Síntesis de L-malato en la producción de vino El sabor agrio de algunos vinos es debido a altas concentraciones de

L-malato. Escriba una secuencia de reacciones en la que se muestre de qué modo las células de levadura sintetizan L-malato a partir de glucosa en condiciones anaeróbicas en presencia de CO_2 disuelto (HCO_3^-). Tenga en cuenta que la reacción global para esta fermentación no puede comportar el consumo de coenzimas de nicotinamida o intermediarios del ciclo del ácido cítrico.

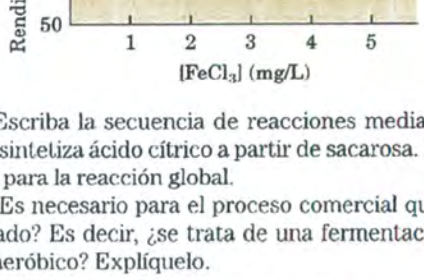
24. Síntesis neta de α-cetoglutarato El α-cetoglutarato desempeña un papel central en la biosíntesis de diversos aminoácidos. Escriba una secuencia de reacciones enzimáticas que pueda llevar a la síntesis neta de α-cetoglutarato a partir de piruvato. La secuencia propuesta no debe comportar el consumo neto de otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Escriba una ecuación para la reacción global e identifice la procedencia de cada reactivo.

25. Rutas anfibólicas Explique, dando ejemplos, qué se entiende al decir que el ciclo del ácido cítrico es anfibólico.

26. Regulación del complejo de la piruvato deshidrogenasa En tejidos animales, la velocidad de conversión del piruvato en acetil-CoA está regulada por la relación de complejo de la PDH fosforilada activa frente a la forma desfosforilada inactiva. Determine qué le ocurre a la velocidad de esta reacción cuando se trata una preparación de mitocondria de músculo de conejo que contiene el complejo de la PDH con: (a) piruvato deshidrogenasa quinasa, ATP y NADH; (b) piruvato deshidrogenasa fosfatasa y Ca^{2+}; (c) malonato.

27. Síntesis comercial de ácido cítrico El ácido cítrico se utiliza como agente aromatizante en refrescos, zumos de frutas y muchos otros tipos de alimentos. El mercado del ácido cítrico produce a nivel mundial centenares de millones de dólares al año. La producción comercial utiliza el hongo *Aspergillus niger*, que metaboliza la sacarosa en condiciones cuidadosamente controladas.

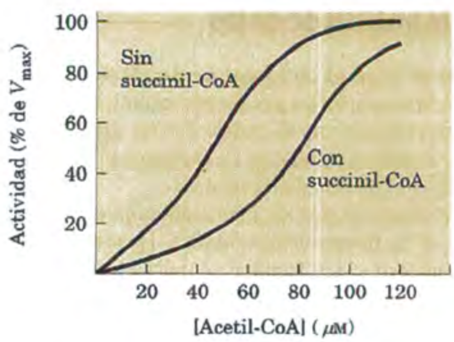
(a) El rendimiento de ácido cítrico depende fuertemente de la concentración de $FeCl_3$ en el medio de cultivo, tal como se indica en el gráfico. ¿Por qué baja el rendimiento cuando la concentración de Fe^{3+} está por debajo o por encima del valor óptimo de 0,5 mg/L?



(b) Escriba la secuencia de reacciones mediante las que *A. niger* sintetiza ácido cítrico a partir de sacarosa. Escriba una ecuación para la reacción global.

(c) ¿Es necesario para el proceso comercial que el cultivo esté aireado? Es decir, ¿se trata de una fermentación o de un proceso aeróbico? Explíquelo.

28. Regulación de la citrato sintasa En presencia de cantidades saturantes de oxalacetato, la actividad de la citrato sintasa de tejido de corazón de cerdo presenta una dependencia sigmoidea con respecto a la concentración de acetil-CoA, tal como se indica en la gráfica. Cuando se añade succinil-CoA, la curva experimenta un desplazamiento hacia la derecha y se acentúa la dependencia sigmoidea.



Basándose en estas observaciones, sugiera de qué modo el succinil-CoA regula la actividad de la citrato sintasa. (Pista: Véase la Fig. 6–34). ¿Por qué el succinil-CoA es una señal apropiada para la regulación del ciclo del ácido cítrico? ¿De qué modo la regulación de la citrato sintasa controla la velocidad de respiración celular en el tejido de corazón de cerdo?

29. Regulación de la piruvato carboxilasa La carboxilación del piruvato por la piruvato carboxilasa tiene lugar a una velocidad muy baja a menos que esté presente el acetil-CoA, un modulador alostérico positivo. Si acaba de ingerir una comida rica en ácidos grasos (triacilgliceroles) pero baja en glúcidos (glucosa), ¿cómo detiene esta propiedad reguladora la oxidación de glucosa a CO_2 y H_2O pero incrementa la oxidación del acetil-CoA procedente de los ácidos grasos?

30. Relación entre respiración y ciclo del ácido cítrico Aunque el oxígeno no participa directamente en el ciclo del ácido cítrico, el ciclo opera únicamente cuando está presente O_2. ¿Por qué?

31. Efecto de [NADH]/[NAD⁺] sobre el ciclo del ácido cítrico ¿Cómo esperaría que respondiese el funcionamiento del ciclo del ácido cítrico a un incremento rápido de la razón $[NADH]/[NAD^+]$ dentro de la matriz mitocondrial? ¿Por qué lo esperaría?

32. Termodinámica de la reacción de la citrato sintasa en las células El citrato se forma por condensación de acetil-CoA con oxalacetato, catalizada por la citrato sintasa:

$$\text{Oxalacetato} + \text{acetil-CoA} + H_2O \longrightarrow \text{citrato} + \text{CoA} + H^+$$

En mitocondrias de corazón de rata a pH 7,0 y 25 °C, las concentraciones de reactivos y productos son: oxalacetato, 1 μM; acetil-CoA, 1 μM; citrato, 220 μM, y CoA, 65 μM. La variación de energía libre estándar para la reacción de la citrato sintasa es −32,2 kJ/mol. ¿Cual es la dirección del flujo de metabolito a través de la reacción de la citrato sintasa en células de corazón de rata? Explíquelo.

33. Reacciones del complejo de la piruvato deshidrogenasa En dos de los pasos de la descarboxilación oxidativa del piruvato (pasos ④ y ⑤ en la Fig. 16–6) no interviene ninguno de los tres carbonos del piruvato a pesar de ser esenciales para la acción del complejo de la PDH. Explíquelo.

34. Mutantes el ciclo del ácido cítrico Existen muchos casos de enfermedades humanas en la que una u otra actividad enzimática está ausente debido a mutación genética. No obstante, son rarísimos los casos de individuos que carecen de uno de los enzimas del ciclo del ácido cítrico. ¿Por qué?

35. División entre los ciclos del ácido cítrico y del glioxilato En un organismo (tal como *E. coli*) que tiene tanto el ciclo del ácido cítrico como el del glioxilato ¿qué es lo que determina que el citrato entre en una u otra vía?

Problema de análisis de datos

36. ¿Cómo se dedujo el ciclo del ácido cítrico? Varios investigadores determinaron los detalles bioquímicos del ciclo del ácido cítrico durante varias décadas. En un artículo del año 1937 Krebs y Johnson resumieron su trabajo y el de otros en la primera descripción publicada de esta vía.

Los métodos usado por los investigadores eran muy diferentes de los de la bioquímica moderna. Hasta la década de 1940 no había acceso a la utilización de marcadores radiactivos, por lo que Krebs y otros investigadores tuvieron que utilizar técnicas no trazadoras para deducir la vía. Utilizando muestras frescas de músculo pectoral de pichón, determinaron el consumo de oxígeno, provocado al suspender músculo triturado en tampón dentro de un matraz sellado, midiendo el volumen (en μL) de oxígeno consumido en diferentes condiciones. Midieron las concentraciones de sustratos (intermediarios) tratando las muestras con ácido para eliminar las proteínas contaminantes y determinaron a continuación las cantidades de diversas moléculas orgánicas pequeñas. Las dos observaciones clave que permitieron a Krebs y colaboradores proponer un *ciclo* del ácido cítrico, en contraposición a una *ruta lineal* se realizaron en los siguientes experimentos.

Experimento I. Incubaron 460 mg de músculo triturado en 3 mL de tampón a 40 °C durante 150 minutos. La adición de *citrato* aumentó el consumo de oxígeno en 893 μL en comparación con muestras a las que no había adicionado citrato. Calcularon, basándose en el O_2 consumido durante la respiración de otros compuetos carbonados, que el consumo de O_2 esperado para la respiración completa de esta cantidad de citrato era de sólo 302 μL.

Experimento II. Midieron el consumo de oxígeno provocado por 460 mg de músculo triturado en 3 mL de tampón cuando se incubaba con *citrato* y/o *1-fosfoglicerol* (glicerol 1-fosfato); compuesto que se sabía que era rápidamente oxidado por la respiración celular) a 40 °C durante 140 minutos. Los resultados se muestran en la tabla.

Muestra	Sustrato(s) añadido(s)	μL O_2 absorbido
1	No extra	342
2	0,3 mL 0,2 M 1-fosfoglicerol	757
3	0,15 mL 0,02 M citrato	431
4	0,3 mL 0,2 M 1-fosfoglicerol y 0,15 mL 0,02 M citrato	1.385

(a) ¿Por qué el consumo de O_2 es una buena medida de la respiración celular?

(b) ¿Por qué la muestra 1 (tejido muscular sin suplementos) consume una cierta cantidad de oxígeno?

(c) Basándose en los resultados de las muestra 2 y 3, ¿puede concluir que el 1-fosfoglicerol y el citrato actúan como sustratos para la respiración celular en este sistema? Razónelo.

(d) Krebs y colaboradores utilizaron los resultados de estos experimentos para sugerir que el citrato era "catalítico", es decir, que ayudaba a las muestras de tejido a metabolizar 1-fosfoglicerol de manera más completa. ¿Cómo utilizaría sus datos para apoyar su conclusión?

(e) Krebs y colaboradores argumentaron que el citrato no sólo era consumido por estas reacciones sino que baía de ser *regenerado*. Por este motivo las reacciones habían de contituir un *ciclo* y no una vía lineal. ¿Cómo apoyaría esta deducción?

Otros investigadores habían encontrado que el *arsenato* (AsO_4^{3-}) inhibe la α-cetoglutarato deshidrogenasa y que el *malonato* inhibe la succinato deshidrogenasa.

(f) Krebs y colaboradores encontraron que las muestras de tejido muscular tratadas con arsenato y citrato consumirían citrato únicamente en presencia de oxígeno; y en estas condiciones, se consumía oxígeno. Basándose en la ruta de la Figura 16–7, ¿en qué se convertía el citrato en este experimento? ¿Por qué las muestras consumían oxígeno?

En su artículo Krebs y Johnson también aportaron lo siguiente. (1) En presencia de arsenato, 5,48 mmol de citrato se convirtieron en 5,07 mmol de α-cetoglutarato. (2) En presencia de malonato, el citrato se convertía de modo cuantitativo en grandes cantidades de succinato y pequeñas cantidades de α-cetoglutarato. (3) La adición de oxalacetato en ausencia de oxígeno condujo a la producción de grandes cantidades de citrato; la cantidad aumentaba si también se añadía glucosa.

Otros investigadores habían encontrado la siguiente ruta en preparaciones de tejido muscular similares:

Succinato $\longrightarrow$ **fumarato** $\longrightarrow$ **malato** $\longrightarrow$ **oxalacetato** $\longrightarrow$ **piruvato**

(g) Basándose únicamente en los datos presentados en este problema, ¿cuál es el orden de los intermediarios del ciclo? ¿Concuerda ello con la Figura 16-7? Justifique su respuesta.

(h) ¿Por qué fue importante demostrar la conversión *cuantitativa* del citrato en α-cetoglutarato?

El artículo de Krebs y Johnston también contiene otros datos que rellenaban la mayoría de componentes que faltaban en el ciclo. El único componente que quedaba por identificar era la molécula que reaccionaba con el oxalacetato para formar citrato.

Referencia

Krebs, H.A. & Johnson, W.A. (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* **4**, 148–156. [Reimpreso (1980) en *FEBS Lett.* **117** (Suppl.), K2–K10.]

17

> Jack Sprat no podía comer grasas,
> su esposa no podía comer magro,
> y como puede ver, entre los dos,
> lamían el plato dejándolo limpio.
>
> —*John Clarke,* Paroemiologia Anglo-Latina (Proverbios en inglés y latín), *1639*

Catabolismo de los ácidos grasos

La oxidación de los ácidos grasos de cadena larga hasta acetil-CoA es una ruta central de producción de energía en muchos organismos y tejidos. En el corazón y en el hígado de mamíferos proporciona hasta el 80% de las necesidades energéticas en todas las circunstancias fisiológicas. Los electrones eliminados de los ácidos grasos durante la oxidación pasan a través de la cadena respiratoria impulsando la síntesis de ATP; el acetil-CoA formado a partir de los ácidos grasos puede oxidarse completamente a CO_2 a través del ciclo del ácido cítrico, con lo que la conservación de energía es aún mayor. En algunas especies y en algunos tejidos, el acetil-CoA puede seguir rutas alternativas. En el hígado, el acetil-CoA se puede convertir en cuerpos cetónicos, combustibles hidrosolubles que se exportan al cerebro y a otros tejidos cuando no hay glucosa disponible. En las plantas superiores, el acetil-CoA se utiliza preferentemente como precursor biosintético y sólo juega un papel secundario como combustible. A pesar de las diferencias existentes en la función biológica de la oxidación de ácidos grasos entre los diferentes organismos, el mecanismo es esencialmente el mismo. Este capítulo se centra principalmente en el proceso repetitivo de cuatro pasos denominado **β-oxidación,** por el que los ácidos grasos se convierten en acetil-CoA.

En el Capítulo 10 describimos las propiedades de los triacilgliceroles (también denominados triglicéridos o grasas neutras) que son especialmente adecuados como combustibles de reserva. Las largas cadenas alquílicas de sus ácidos grasos constituyentes son esencialmente hidrocarburos, estructuras muy reducidas con una energía de oxidación completa (~38 kJ/g) que es más del doble de la correspondiente al mismo peso de proteína o de glúcido. Esta ventaja va acompañada de la extrema insolubilidad de los lípidos en agua; los triacilgliceroles celulares se agregan en gotículas de lípido, que no aumentan la osmolaridad del citosol y no están solvatadas. (Por el contrario, en los polisacáridos de almacenamiento el agua de solvatación puede constituir las dos terceras partes del peso total de las moléculas almacenadas.) Por otra parte, debido a su relativa inercia química, los triacilgliceroles se pueden almacenar en grandes cantidades en las células sin riesgo de que se produzcan reacciones químicas no deseadas con otros constituyentes celulares.

Sin embargo, las mismas propiedades que convierten a los triacilgliceroles en buenos compuestos de almacenamiento hacen que presenten problemas en su papel como combustibles. Dada su insolubilidad en agua, los triacilgliceroles ingeridos deben ser emulsionados antes de poder ser digeridos a cargo de enzimas hidrosolubles en el intestino, y los triacilgliceroles absorbidos en el intestino, o movilizados desde los tejidos donde son almacenados, deben transportarse en el torrente circulatorio mediante la acción de proteínas que compensansu insolubilidad. Para superar la relativa estabilidad de los enlaces C—C de un ácido graso, el grupo carboxílico en C-1 es activado por la unión al coenzima A, lo que permite la oxidación por pasos del grupo acilo graso en la posición C-3 o β; de ahí el nombre de β-oxidación.

Empezaremos este capítulo con una breve discusión acerca de las fuentes de ácidos grasos y de las rutas de transporte al lugar donde se produce su oxidación, poniendo un énfasis especial en el proceso en los vertebrados. A continuación se describirán las etapas químicas de la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias. Existen tres etapas en la oxidación completa de ácidos grasos a CO_2 y H_2O: la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga a fragmentos de dos átomos de carbono, en forma de acetil-CoA (β-oxidación); la oxidación del acetil-CoA a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16), y la transferencia de electrones desde los transportadores electrónicos reducidos a la cadena respiratoria mitocondrial (Capítulo 19). En este capítulo nos centraremos en la primera de estas etapas. Empezamos nuestra consideración sobre la β-oxidación con el caso simple por el que un ácido graso completamente saturado y con un número par de átomos de carbono es degradado a acetil-CoA. A continuación estudiaremos brevemente las transformaciones adicionales necesarias para la degradación de ácidos grasos insaturados o que posean un número impar de átomos de carbono. Finalmente, comentaremos las variaciones sobre el tema de la β-oxidación que se producen en orgánulos especializados —peroxisomas y glioxisomas— y dos rutas menos corrientes del catabolismo de los ácidos grasos: ω- y α-oxidación. El capítulo concluirá con una descripción de una ruta alternativa seguida por el acetil-CoA formado en la β-oxidación en vertebrados: la producción de cuerpos cetónicos en el hígado.

17.1 Digestión, movilización y transporte de grasas

Las células pueden obtener ácidos grasos combustibles a partir de tres fuentes: grasas consumidas en la dieta, grasas almacenadas en las células en forma de gotículas de lípidos y grasas sintetizadas en un órgano y que se exportan a otro. Algunas especies utilizan las tres fuentes en diversas circunstancias, mientras que otras solamente utilizan una o dos. Los vertebrados, por ejemplo, obtienen grasas de la dieta, movilizan grasas almacenadas en tejidos especializados (tejido adiposo, constituido por células denominadas adipocitos) y, en el hígado, convierten en grasas los glúcidos que se encuentran en exceso en la dieta para exportarlos a otros tejidos. Por término medio, los triacilgliceroles de la dieta suministran el 40% o más del total de energía requerido diariamente por los humanos en países altamente industrializados (a pesar de que la mayoría de recomendaciones dietéticas sugieren que el aporte calórico diario debido a las grasas no supere el 30%). Los triacilgliceroles cubren más de la mitad de las necesidades energéticas de algunos órganos, especialmente el hígado, el corazón y el músculo esquelético en reposo. Los triacilgliceroles almacenados son casi la única fuente de energía utilizada por los animales en hibernación y por las aves migratorias. Los protistas obtienen grasas al consumir organismos situados por debajo de ellos en la cadena trófica, y algunos también almacenan grasas en gotículas de lípido citosólicas. Las plantas vasculares movilizan las grasas almacenadas en las semillas durante el proceso de la germinación pero por lo demás no dependen de las grasas para cubrir sus necesidades energéticas.

Las grasas de la dieta se absorben en el intestino delgado

En los vertebrados, antes de poder ser absorbidos a través de la pared intestinal, los triacilgliceroles ingeridos en forma de partículas macroscópicas insolubles de grasa deben convertirse en micelas microscópicas finamente dispersadas. Esta solubilización se lleva a cabo por sales biliares tales como el ácido taurocólico (p. 357) que se sintetizan en el hígado a partir del colesterol, se almacenan en la vesícula biliar y se liberan al intestino delgado tras la ingestión de una comida que contenga grasas. Las sales biliares son compuestos anfipáticos que actúan como detergentes biológicos, convirtiendo las grasas de la dieta en micelas mixtas de ácidos biliares y triacilgliceroles (**Fig. 17–1**, paso ①). La formación de micelas incrementa enormemente la fracción de moléculas de lípido accesibles a la acción de las lipasas hidrosolubles

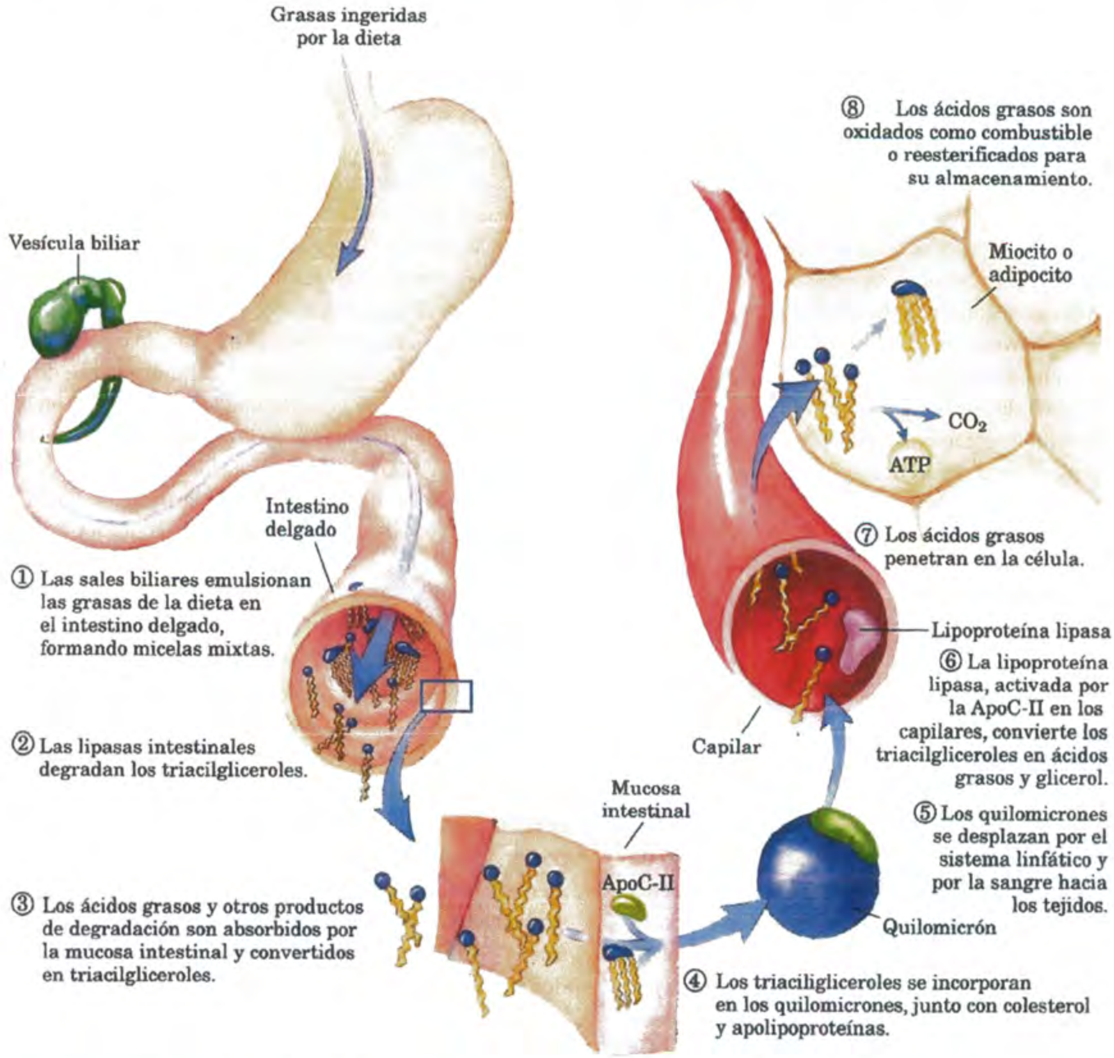


FIGURA 17–1 Procesado de los lípidos de la dieta en los vertebrados. La digestión y absorción de los lípidos de la dieta tiene lugar en el intestino delgado, y los ácidos grasos liberados de los triacilgliceroles se empaquetan y envían a los tejidos muscular y adiposo. Los ocho pasos se explican en el texto.

en el intestino, que convierten los triacilgliceroles en monoacilgliceroles (monoglicéridos) y diacilgliceroles (diglicéridos), ácidos grasos libres y glicerol (paso ②). Estos productos de la acción de las lipasas difunden hacia el interior de las células epiteliales que recubren la superficie intestinal (la mucosa intestinal) (paso ③), donde se convierten de nuevo en triacilgliceroles y se empaquetan junto con colesterol de la dieta y proteínas específicas para formar agregados lipoproteicos denominados **quilomicrones** (**Fig. 17–2**; véase también la Fig. 17–1, paso ④).

Las **apolipoproteínas** son proteínas que se unen a lípidos en la sangre, y son responsables del transporte de triacilgliceroles, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol entre los diferentes órganos. Las apolipoproteínas ("apo" se refiere a la proteína en su forma libre de lípido) se combinan con lípidos para formar varias clases de partículas de **lipoproteínas**, agregados esféricos que contienen lípidos hidrofóbicos en el núcleo y cadenas laterales hidrofílicas de las proteínas y grupos de cabeza de los lípidos en la superficie. Diversas combinaciones de lípidos y proteínas producen partículas de densidad diferente, que van desde los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *very low-density lipoproteins*) a las lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL, *very high-density lipoproteins*), que pueden separarse por ultracentrifugación. En el Capítulo 21 se detallan las estructuras y funciones de estas partículas de lipoproteína en el transporte de lípidos.

La parte proteica de las lipoproteínas es reconocida por receptores en la superficie celular. En el proceso de captación de lípidos desde el intestino, los quilomicrones, que contienen la apolipoproteína C-II (apoC-II), pasan desde la mucosa intestinal al sistema linfático, desde el que penetran en la sangre que los transporta al músculo y al tejido adiposo (Fig. 17–1, paso ⑤). En los capilares de estos tejidos, el enzima extracelular **lipoproteína lipasa,** activado por la apoC–II, hidroliza los triacilgliceroles a ácidos grasos y glicerol (paso ⑥), que son captados por las células de los tejidos diana (paso ⑦). En el músculo, los ácidos grasos se oxidan para obtener energía; en el tejido adiposo, se reesterifican para su almacenamiento en forma de triacilgliceroles (paso ⑧).

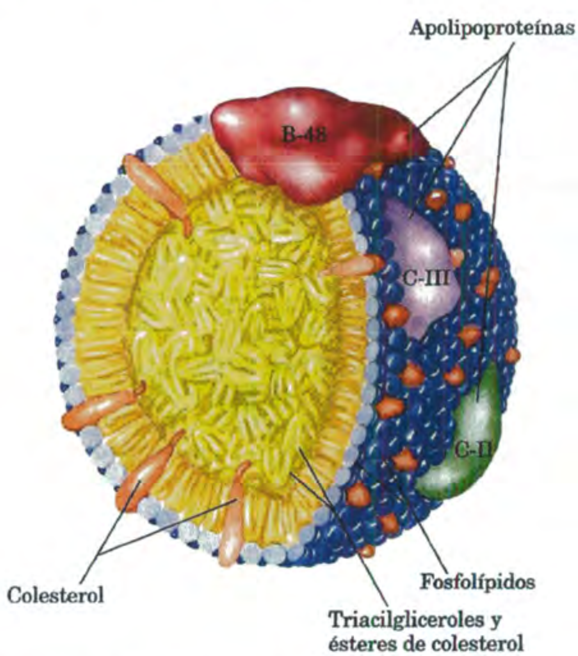


FIGURA 17–2 Estructura molecular de un quilomicrón. La superficie está constituida por una capa de fosfolípidos, con los grupos de cabeza encarados hacia la fase acuosa. Los triacilgliceroles secuestrados en el interior (en amarillo) representan más del 80% de la masa. Varias apolipoproteínas que sobresalen de la superficie (B-48, C-III, C-II) actúan como señales para la captación y metabolismo del contenido de los quilomicrones. El diámetro de los quilomicrones oscila entre 100 y 500 nm.

Los restos de los quilomicrones, de los que se ha retirado la mayor parte de triacilgliceroles pero que todavía contienen colesterol y apolipoproteínas, llegan al hígado a través de la sangre, y allí son captados por endocitosis con intervención de los receptores de sus apolipoproteínas. Los triacilgliceroles que entran en el hígado a través de esta ruta pueden ser oxidados para generar energía o bien para proporcionar precursores para la síntesis de cuerpos cetónicos, tal como se describe en la Sección 17.3. Cuando la dieta contiene más ácidos grasos de los necesarios de modo inmediato como combustible o para obtener precursores, el hígado los convierte en triacilgliceroles, y éstos se empaquetan con apolipoproteínas específicas para formar VLDL. Las VLDL son transportadas en la sangre a los tejidos adiposos, donde los triacilgliceroles son eliminados y almacenados en forma de gotículas de lípido en el interior de los adipocitos.

Las hormonas activan la movilización de triacilgliceroles almacenados

Los lípidos neutros se almacenan en adipocitos (y en células sintetizadoras de esteroides en la corteza adrenal, ovario y testículos) en forma de gotículas de lípido que contienen un núcleo de ésteres del colesterol y triacilgliceroles rodeados por una monocapa de fosfolípidos. La superficie de estas gotículas está revestida con **perilipinas,** una familia de proteínas que restringen el acceso a las gotículas de lípido, impidiendo su movilización inoportuna. Cuando las hormonas señalan que existe una necesidad de energía metabólica, se movilizan (se extraen del almacenamiento) las reservas de triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo y se transportan a los tejidos (músculo esquelético, corazón, corteza suprarrenal) en los que pueden oxidarse ácidos grasos para producir energía. Las hormonas adrenalina y glucagón, secretadas en respuesta a niveles bajos de glucosa en sangre, activan el enzima adenilil ciclasa de la membrana plasmática de los adipocitos (**Fig. 17–3**), el cual produce el segundo mensajero intracelular AMP cíclico (cAMP; véase la Fig. 12–4). La proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) fosforila la perilipina A y la perilipina fosforilada hace que la **lipasa sensible a la acción hormonal** del citosol se traslade a la superficie de la gotícula de lípido, en donde empieza a hidrolizar los triacilgliceroles a ácidos grasos libres y glicerol. La PKA también fosforila la lipasa sensible a hormonas, doblando o triplicando su actividad, pero el incremento de más de 50 veces en la movilización de grasas desencadenada por la adrenalina se debe principalmente a la fosforilación de la perilipina. Las células con genes de perilipina defectuosos casi no presentan respuesta a incrementos en la concentración de cAMP; su lipasa sensible a hormonas no se asocia con las gotículas de lípido.

A medida que la lipasa sensible a hormonas hidroliza triacilgliceroles en los adipocitos, los ácidos grasos así liberados (**ácidos grasos libres, FFA**) pasan desde los adipocitos a la

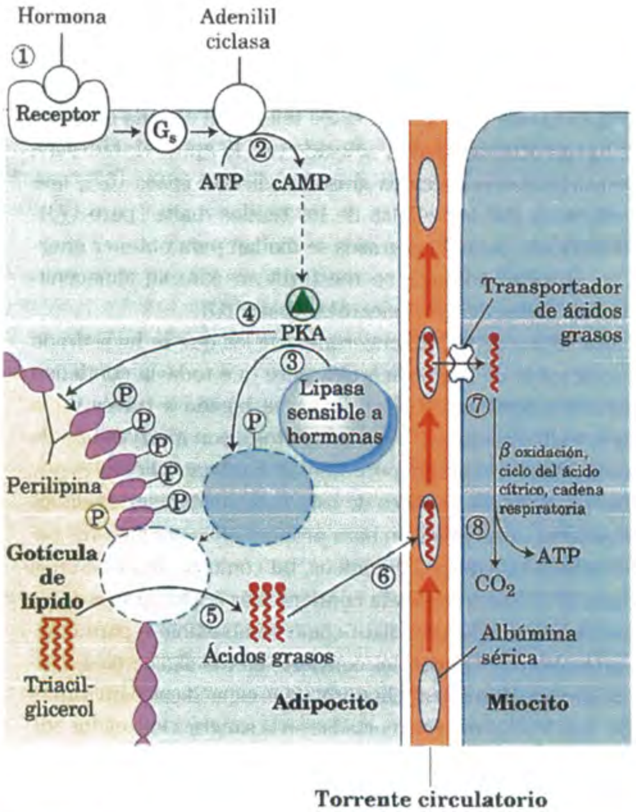


FIGURA 17–3 Movilización de triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo. Cuando los niveles bajos de glucosa en sangre activan la liberación de glucagón, ① la hormona se une a su receptor en la membrana del adipocito y así ② estimula la adenilil ciclasa, vía una proteína G, para producir cAMP. Esto activa la PKA, que fosforila ③ la lipasa sensible a hormona y ④ moléculas de perilipina de la superficie de la gotícula de lípido. La fosforilación de la perilipina permite el acceso de la lipasa sensible a hormona a la superficie de la gotícula de lípido, en donde ⑤ hidroliza triacilgliceroles a ácidos grasos libres. ⑥ Los ácidos grasos abandonan el adipocito, se unen a la albúmina sérica en la sangre y se transportan por el torrente circulatorio; se liberan de la albúmina y ⑦ entran en un miocito mediante un transportador específico de ácidos grasos. ⑧ En el miocito, los ácidos grasos se oxidan a CO_2 al tiempo que la energía de oxidación se conserva en forma de ATP, el cual promueve la contracción muscular y otros procesos metabólicos que requieren energía en el miocito.

sangre, donde se unen a la **albúmina sérica,** una proteína de la sangre. Esta proteína (M_r 66.000), que representa aproximadamente la mitad de la proteína total del suero, llega a unir de forma no covalente hasta 10 ácidos grasos por monómero de proteína. Unidos a esta proteína soluble, los ácidos grasos antes insolubles son transportados a tejidos tales como el músculo esquelético, el corazón y la corteza suprarrenal. En estos tejidos diana, los ácidos grasos se disocian de la albúmina y son transportados por transportadores de la membrana plasmática al interior de las células para servir de combustible.

Aproximadamente el 95% de la energía biológicamente disponible de los triacilgliceroles reside en sus tres ácidos grasos de cadena larga; la parte glicerol sólo contribuye en un 5%. El glicerol liberado por la acción de la lipasa es fosforilado por la **glicerol quinasa (Fig. 17–4)**, y el glicerol 3-fosfato resultante se oxida a dihidroxiacetona fosfato. El enzima glucolítico triosa fosfato isomerasa convierte este compuesto en gliceraldehído 3-fosfato, que se oxida en la glucólisis.

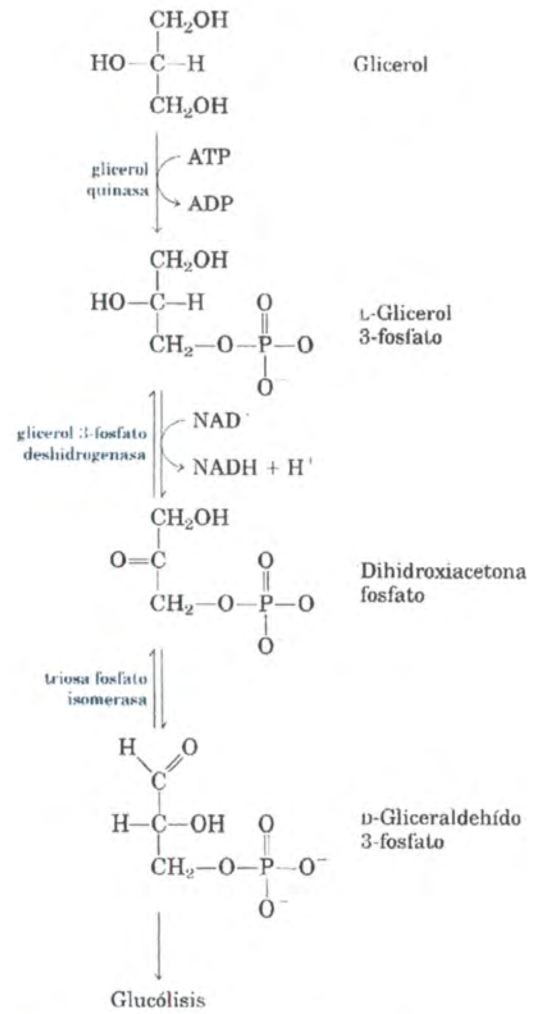


FIGURA 17–4 Entrada del glicerol en la ruta glucolítica.

Los ácidos grasos son activados y transportados al interior de las mitocondrias

Los enzimas de la oxidación de los ácidos grasos en las células animales se localizan en la matriz mitocondrial, como demostraron Eugene P. Kennedy y Albert Lehninger en 1948. Los ácidos grasos con longitudes de cadena de 12 o menos carbonos entran en la mitocondria sin la ayuda de transportadores de membrana. Aquellos con 14 o más carbonos, que constituyen la mayoría de los FFA obtenidos en la dieta o liberados del tejido adiposo, no pueden pasar directamente a través de las membranas mitocondriales, sino que deben someterse antes a las tres reacciones enzimáticas de la **lanzadera de la carnitina.** La primera de ellas está catalizada por una familia de isozimas (diferentes isozimas específicos para ácidos grasos con cadenas carbonadas cortas, intermedias o largas) presentes en la membrana mitocondrial externa, las **acil-CoA sintetasas,** que llevan a cabo la reacción general

$$\text{Ácido graso} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{acil graso–CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Así, las acil-CoA sintetasas catalizan la formación de un enlace tioéster entre el grupo carboxilo del ácido graso y el grupo tiol del coenzima A para generar un **acil graso–CoA,** acoplada a la escisión de ATP a AMP y PP_i. (Recuerde la descripción de

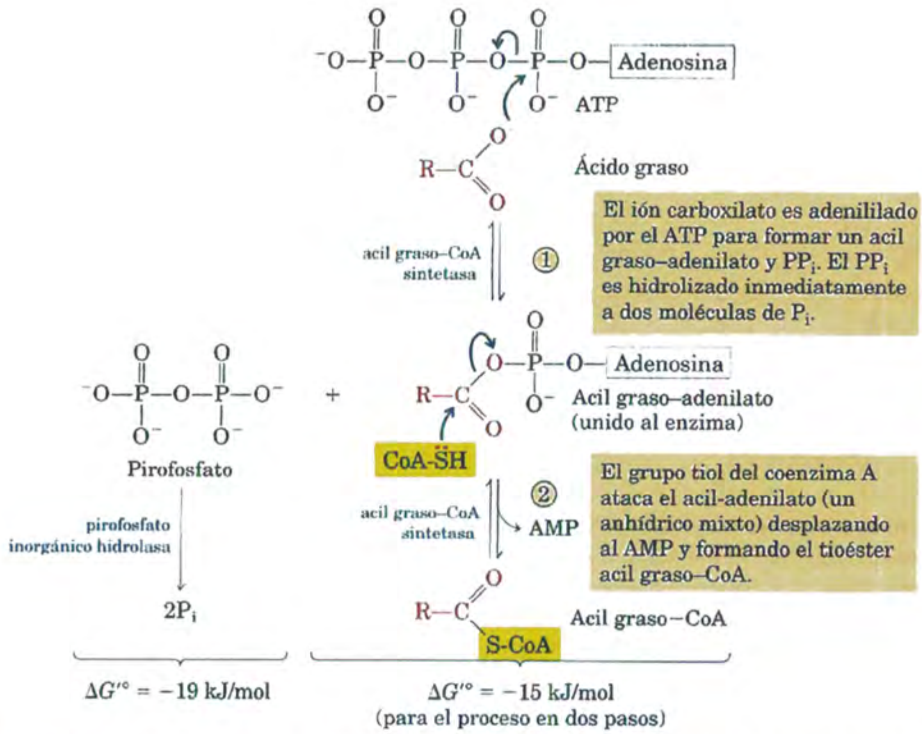


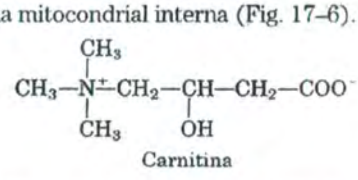
FIGURA DE MECANISMO 17–5 Conversión de un ácido graso en un acil graso–CoA. La conversión está catalizada por la acil graso–CoA sintetasa y la pirofosfato inorgánico hidrolasa. La activación del ácido graso mediante la formación del derivado acil graso–CoA se produce en dos pasos. La reacción global es muy exergónica. **Mecanismo de la acil graso–CoA sintetasa.**

esta reacción en el Capítulo 13, para ilustrar de qué modo la energía libre desprendida en la escisión de los enlaces fosfoanhídrido del ATP puede acoplarse a la formación de un compuesto de alta energía; p. 508). La reacción tiene lugar en dos pasos e implica la formación de un intermedio acil graso–adenilato **(Fig. 17–5)**.

Los acil graso–CoA, del mismo modo que el acetil-CoA, son compuestos de alta energía; su hidrólisis a FFA y CoA presenta una variación grande y de signo negativo de energía libre estándar ($\Delta G'° \approx -31$ kJ/mol). La formación de un acil graso–CoA se hace más favorable mediante la hidrólisis de *dos* enlaces de alta energía en el ATP; el pirofosfato formado en la reacción de activación es hidrolizado inmediatamente por una pirofosfato inorgánico hidrolasa (Fig. 17–5, izquierda), que empuja la reacción de activación precedente en la dirección de formación de acil graso–CoA. La reacción global es

$$\text{Ácido graso} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acil graso–CoA} + \text{AMP} + 2P_i \qquad (17\text{–}1)$$
$$\Delta G'° = -34 \text{ kJ/mol}$$

Los ésteres de acil graso–CoA formados en el lado citosólico de la membrana mitocondrial externa pueden transportarse al interior de la mitocondria y ser oxidados para producir ATP, o pueden utilizarse en el citosol para sintetizar lípidos de membrana. Los ácidos grasos destinados a la oxidación mitocondrial se unen transitoriamente al grupo hidroxilo de la **carnitina** para formar acil–carnitina, segunda reacción de la lanzadera. Esta transesterificación es catalizada por la **carnitina aciltransferasa I** (M_r 88.000) de la membrana externa. El acil-CoA pasa a través de la membrana externa y se convierte en éster de carnitina en el espacio intermembrana **(Fig. 17–6)** o bien el éster de carnitina se forma en el lado citosólico de la membrana externa, y a continuación es transportado a través de la membrana externa al espacio intermembrana (los datos actuales no revelan cuál de los dos mecanismos tiene lugar). En los dos casos, el paso a través del espacio intermembrana (el espacio entre las membranas externa e interna) tiene lugar a través de grandes poros (formados por la proteína porina) de la membrana externa. El éster acil graso–carnitina penetra a continuación en la matriz por difusión facilitada mediante el **transportador de acil-carnitina/carnitina** de la membrana mitocondrial interna (Fig. 17–6).



Carnitina

En el tercer y último paso de la lanzadera de carnitina, el grupo acilo graso se transfiere enzimáticamente desde la carnitina al coenzima A intramitocondrial por la **carnitina aciltransferasa II**. Este isozima, localizado en la cara interna de la membrana mitocondrial interna, regenera el acil graso–CoA y lo libera, con la carnitina libre, al interior de la matriz (Fig. 17–6). La carnitina vuelve a penetrar en el espacio intermembrana mediante el transportador de acil–carnitina/carnitina.

Este proceso en tres pasos para la transferencia de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria —esterificación con el CoA, transesterificación a la carnitina seguida de transporte, y transesterificación de nuevo con CoA— une dos fondos (pools) separados de coenzima A y de acil graso–CoA, uno en el citosol y otro en la mitocondria. Estos dos fondos tienen funciones diferentes. El coenzima A de la matriz mitocondrial se

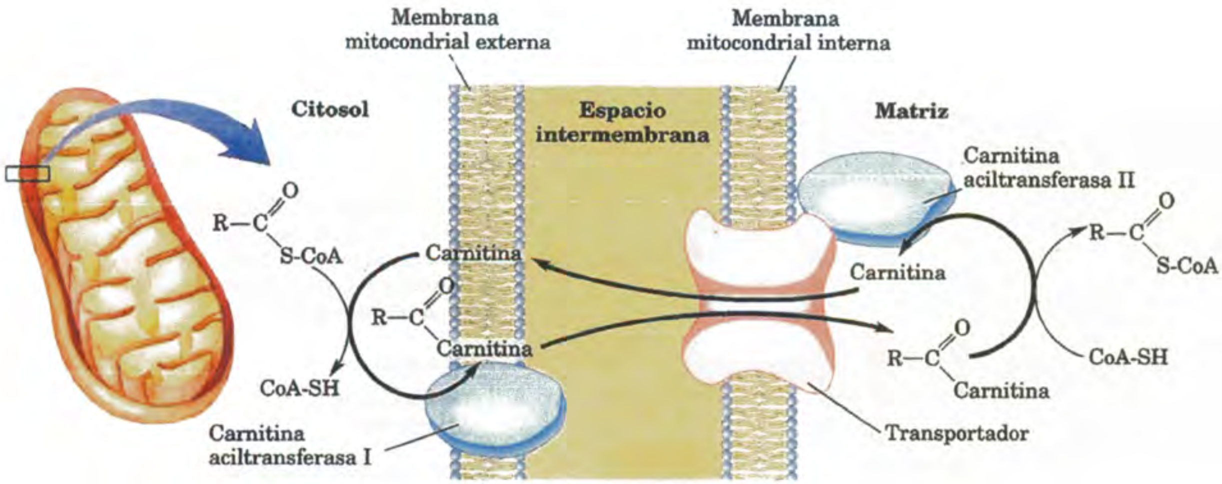


FIGURA 17–6 Entrada de los ácidos grasos en la mitocondria a través del transportador acil–carnitina/carnitina. Después de su formación en la membrana externa o en el espacio intermembrana, el acil graso–carnitina penetra en la matriz por difusión facilitada a través del transportador de la membrana interna. En la matriz, el grupo acilo se transfiere al CoA mitocondrial, liberando carnitina que retorna al espacio intermembrana utilizando el mismo transportador. La aciltransferasa I es inhibida por el manolil-CoA, el primer intermediario de la síntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21–1). Esta inhibición evita la síntesis y degradación simultáneas de ácidos grasos.

usa fundamentalmente en la degradación oxidativa de piruvato, ácidos grasos y algunos aminoácidos, mientras que el coenzima A citosólico se utiliza en la biosíntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21–10). El acil graso–CoA del fondo citosólico puede utilizarse para la síntesis de lípidos de membrana o puede transportarse a la matriz mitocondrial para oxidación y producción de ATP. La conversión en el éster de carnitina compromete la porción acilo graso a un destino oxidativo.

El proceso de entrada en el que interviene la carnitina es el paso limitante de la velocidad de la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias y, como se verá posteriormente, es un punto de regulación. Una vez en el interior de la mitocondria, el acil graso–CoA es procesado rápidamente por parte de un grupo de enzimas de la matriz.

RESUMEN 17.1 Digestión, movilización y transporte de grasas

- Los ácidos grasos de los triacilgliceroles proporcionan una fracción importante de la energía oxidativa en los animales. Los triacilgliceroles ingeridos con la dieta se emulsionan en el intestino delgado con las sales biliares, son hidrolizados por las lipasas intestinales, absorbidos por las células epiteliales del intestino, reconvertidos en triacilgliceroles y a continuación incorporados en los quilomicrones al combinarse con apolipoproteínas específicas.
- Los quilomicrones aportan triacilgliceroles a los tejidos, donde la lipoproteína lipasa libera los ácidos grasos para que entren en las células. Los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo se movilizan por acción de una triacilglicerol lipasa sensible a hormonas. Los ácidos grasos liberados se unen a la albúmina sérica y son transportados a través de la sangre al corazón, al músculo esquelético y a otros tejidos que utilizan los ácidos grasos como combustible.
- Una vez en el interior de las células, los ácidos grasos se activan en la membrana mitocondrial externa por conversión a tioésteres acil graso–CoA. Los acil graso–CoA que se han de oxidar entran en la mitocondria en tres pasos por la vía de la lanzadera de carnitina.

17.2 Oxidación de los ácidos grasos

Tal como se ha señalado anteriormente, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos se produce en tres fases **(Fig. 17–7)**. En la primera fase —la β-oxidación— los ácidos grasos experimentan la eliminación oxidativa de unidades sucesivas de dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA, a partir del extremo carboxilo de la cadena de ácido graso. Por ejemplo, el ácido palmítico, de 16 átomos de carbono (palmitato a pH 7), se somete siete veces a esta secuencia oxidativa, perdiendo en cada uno de los pasos dos carbonos en forma de acetil-CoA. Al final de los siete ciclos, los dos últimos átomos de carbono del palmitato (originalmente C-15 y C-16) quedan en forma de acetil-CoA. El resultado global es la conversión de la cadena de 16 carbonos del palmitato en ocho grupos acetilo de dos carbonos de las moléculas de acetil-CoA. La formación de cada acetil-CoA requiere la eliminación de cuatro átomos de hidrógeno (dos pares de electrones y cuatro H^+) de la parte acilo graso por parte de deshidrogenasas.

En la segunda fase de la oxidación de ácidos grasos, los grupos acetilo del acetil-CoA se oxidan a CO_2 a través del ciclo del ácido cítrico, que también tiene lugar en la matriz mitocondrial. El acetil-CoA procedente de la oxidación de ácidos grasos entra de este modo en una ruta oxidativa final común junto con acetil-CoA procedente de la glucosa vía glucólisis y oxidación del piruvato (véase la Fig. 16–1). Las dos primeras fases de la oxidación de ácidos grasos producen los transportadores electrónicos reducidos NADH y $FADH_2$, que en la tercera fase donarán sus electrones a la cadena respiratoria mitocondrial, a través de la cual se transportan los electrones hacia el oxígeno,

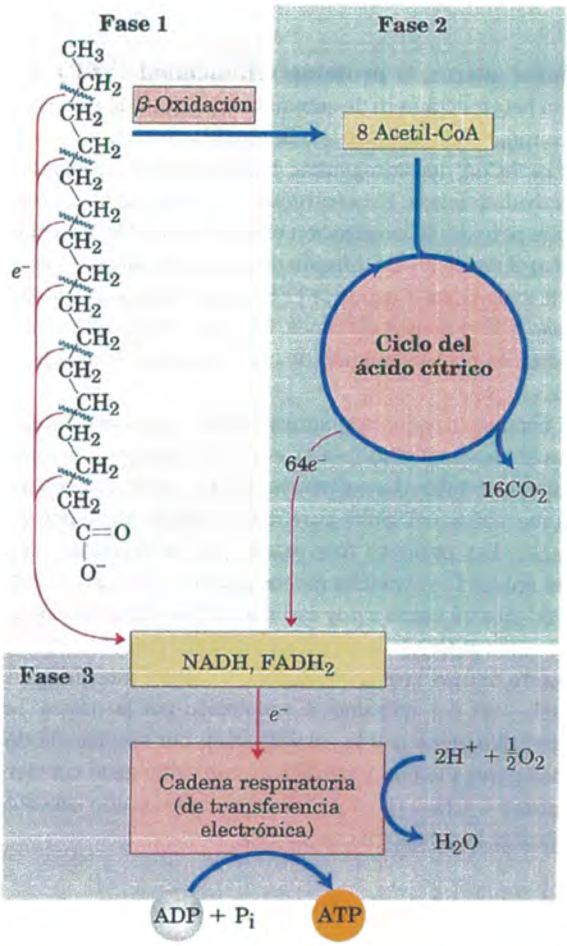


FIGURA 17–7 Fases de la oxidación de ácidos grasos. Fase 1: Un ácido graso de cadena larga se oxida para generar residuos acetilo en forma de acetil-CoA. Este proceso se denomina β-oxidación. Fase 2: Los grupos acetilo se oxidan a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico. Fase 3: Los electrones obtenidos en las oxidaciones de las fases 1 y 2 se transfieren al O_2 a través de la cadena respiratoria mitocondrial, proporcionando la energía necesaria para la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa.

con la fosforilación concomitante de ADP a ATP (Fig. 17–7). De este modo la energía liberada por la oxidación de los ácidos grasos se conserva en forma de ATP.

Describiremos a continuación con mayor detalle la primera fase de la oxidación de los ácidos grasos, empezando por el caso sencillo de una cadena de ácido graso saturada con número par de átomos de carbono, y a continuación el caso ligeramente más complicado de cadenas no saturadas y de número impar. Veremos a continuación la regulación de la oxidación de ácidos grasos, los procesos β-oxidativos que se dan en otros orgánulos que no son la mitocondria y finalmente dos formas menos generales del catabolismo de los ácidos grasos, la α oxidación y la ω oxidación.

La β-oxidación de los ácidos grasos saturados se produce en cuatro pasos básicos

Cuatro reacciones catalizadas por enzimas constituyen la primera fase de la oxidación de ácidos grasos **(Fig. 17–8a)**. En primer lugar, la deshidrogenación del acil graso–CoA genera un doble enlace entre los átomos de carbono α y β (C-2 y C-3), dando lugar a un ***trans*-Δ^2-enoil-CoA** (el símbolo Δ^2 designa la posición del doble enlace; puede ser de utilidad revisar la nomenclatura de ácidos grasos, p. 343). Observe que el nuevo doble enlace tiene configuración *trans*, mientras que los ácidos grasos insaturados naturales tienen normalmente sus enlaces dobles en configuración *cis*. Más tarde veremos el significado de esta diferencia.

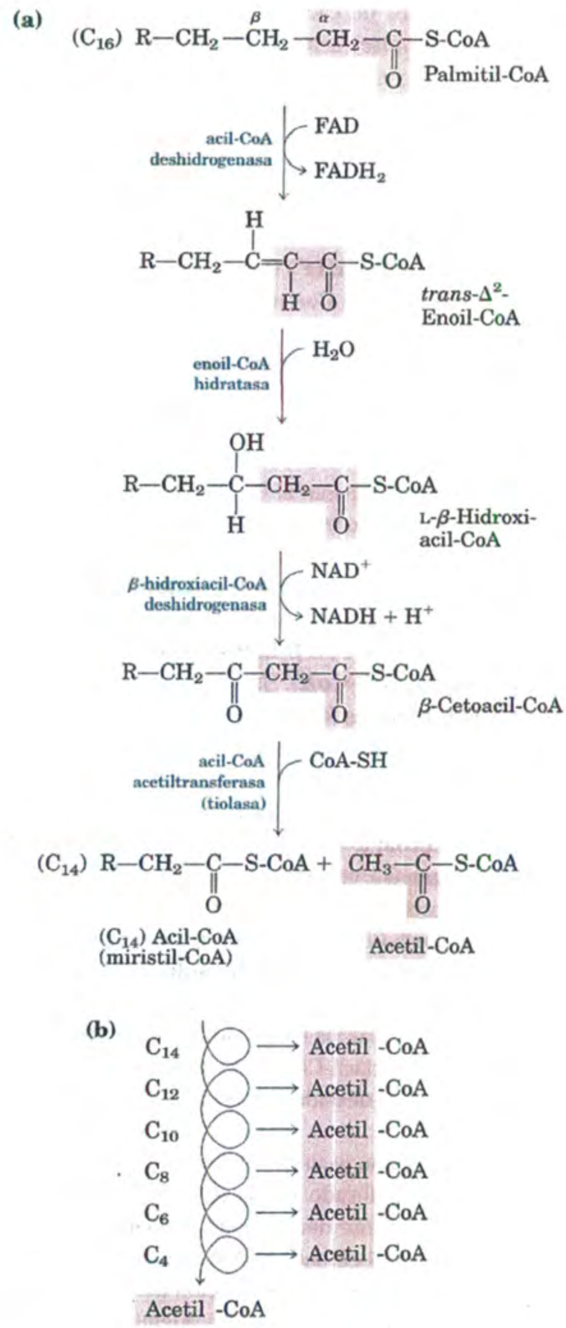


FIGURA 17–8 Ruta de la β-oxidación. (a) En cada uno de los pases a través de esta secuencia de cuatro pasos, un grupo acetilo (sombreado en rosa) es eliminado en forma de acetil-CoA del extremo carboxilo de la cadena del ácido graso, en este ejemplo palmitato (C_{16}), que entra como palmitil-CoA. **(b)** Seis pases más a través de la vía generan siete nuevas moléculas de acetil-CoA, la séptima de las cuales procede de los dos últimos átomos de carbono de la cadena de 16 carbonos. En total se forman ocho moléculas de acetil-CoA.

Este primer paso está catalizado por tres isozimas de la **acil-CoA deshidrogenasa** cada uno específico para un intervalo de longitudes de la cadena del ácido graso: la acil-CoA de cadena muy larga deshidrogenasa (VLCAD, *very long-chain acyl-CoA-dehydrogenase*) actúa sobre ácidos grasos de 12 a 18 carbonos, y los isozimas específicos para ácidos grasos de cadena media (MCAD, *medium-chain acyl-CoA-dehydrogenase*) y ácidos grasos de cadena corta (SCAD, *short-chain acyl-CoA-dehydrogenase*) actúan, respectivamente, sobre ácidos grasos de 4 a 14 y de 4 a 8 carbonos. Los tres isozimas son flavoproteínas con FAD (véase la Fig. 13–27) como grupo prostético. Los electrones eliminados del acil graso–CoA se transfieren al FAD, y la forma reducida de la deshidrogenasa cede inmediatamente sus electrones a un transportador electrónico de la cadena respiratoria mitocondrial, la **flavoproteína transferidora de electrones (ETF)** (véase la Fig. 19–8). La oxidación catalizada por una acil-CoA deshidrogenasa es análoga a la deshidrogenación del succinato en el ciclo del ácido cítrico (p. 628); en ambas reacciones el enzima está unido a la membrana interna, se introduce un doble enlace en un ácido carboxílico entre los átomos de carbono α y β, el FAD actúa de aceptor de electrones y los electrones de la reacción entran finalmente en la cadena respiratoria y pasan al O_2, produciéndose la síntesis concomitante de alrededor de 1,5 moléculas de ATP por par de electrones.

En el segundo paso del ciclo de la β-oxidación (Fig. 17–8a), se adiciona agua al doble enlace del *trans*-Δ^2-enoil–CoA para formar el estereoisómero L del **β-hidroxiacil-CoA** (también denominado **3-hidroxiacil-CoA**). Esta reacción, catalizada por la **enoil-CoA hidratasa,** es formalmente análoga a la reacción de la fumarasa del ciclo del ácido cítrico, en la que se adiciona H_2O a un doble enlace α–β (p. 628).

En el tercer paso, se deshidrogena el L-β-hidroxiacil-CoA para formar **β-cetoacil-CoA** por acción de la **β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa;** el NAD^+ es el aceptor de electrones. Este enzima es absolutamente específico para el estereoisómero L del hidroxiacil–CoA. El NADH formado en esta reacción dona sus electrones a la **NADH deshidrogenasa,** un transportador electrónico de la cadena respiratoria, y se forma ATP a partir de ADP al pasar los electrones al O_2. La reacción catalizada por la β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa es análoga a la reacción de la malato deshidrogenasa del ciclo del ácido cítrico (p. 628).

El cuarto y último paso del ciclo de la β-oxidación de ácidos grasos está catalizado por la **acil-CoA acetiltransferasa,** más comúnmente denominada **tiolasa,** que promueve la reacción entre el β-cetoacil-CoA y una molécula de coenzima A libre para dar lugar a la separación del fragmento carboxilo terminal de dos carbonos de la cadena original de ácido graso en forma de acetil-CoA. El otro producto es el tioéster de coenzima A del ácido graso con dos carbonos menos (Fig. 17–8a). Esta reacción se conoce como tiólisis, por analogía con el proceso de hidrólisis, dado que el β-cetoacil-CoA se rompe por reacción con el grupo tiol del coenzima A.

Los tres últimos pasos de esta secuencia de cuatro pasos están catalizados por uno de dos conjuntos de enzimas, según sea la longitud de la cadena de acilo graso. Para cadenas de acilo graso de 12 o más carbonos, las reacciones están catalizadas por un complejo multienzimático asociado a la membrana mitocondrial interna, la **proteína trifuncional (TFP).** La TFP es un heterooctámero de subunidades $\alpha_4\beta_4$. Cada subunidad α contiene dos actividades, la enoil-CoA hidratasa y la β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; las subunidades β contienen la actividad tiolasa. Esta estrecha asociación de tres enzimas puede permitir la canalización eficiente del sustrato de un sitio activo al siguiente sin difusión de los intermedios desde la superficie enzimática. Cuando la TFP ha acortado la cadena de acilo graso a 12 o menos carbonos, las siguientes oxidaciones son catalizadas por un conjunto de cuatro enzimas solubles de la matriz.

Tal como se ha señalado anteriormente, el enlace simple entre los grupos metileno (—CH_2—) de los ácidos grasos es relativamente estable. La secuencia de la β-oxidación constituye un mecanismo elegante para desestabilizar y romper estos enlaces. Las primeras tres reacciones de la β-oxidación crean un enlace C—C mucho menos estable, en el que el carbono α (C-2) está unido a *dos* carbonos carbonílicos (el intermedio β-cetoacil-CoA). La función cetona del carbono β (C-3) lo convierte un una buena diana para el ataque nucleofílico a cargo del —SH del coenzima A, catalizado por la tiolasa. La acidez del hidrógeno α y la estabilización por resonancia del carbanión generado por la pérdida de este hidrógeno convierten al grupo —CH_2—CO—S-CoA en un buen grupo saliente, lo que facilita la rotura del enlace α–β.

Los cuatro pasos de la β-oxidación se repiten para generar acetil-CoA y ATP

En un paso a través de la secuencia de la β-oxidación, se eliminan una molécula de acetil-CoA, dos pares de electrones y cuatro protones (H^+) del acil graso–CoA de cadena larga, acortándolo en dos átomos de carbono. La ecuación correspondiente a un solo paso, comenzando con el éster de coenzima A de nuestro ejemplo, el palmitato, es

$$\text{Palmitil-CoA} + \text{CoA} + \text{FAD} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{miristil-CoA} + \text{acetil-CoA} + \text{FADH}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (17\text{–}2)$$

Después de la eliminación de una unidad de acetil-CoA del palmitil-CoA, queda el tioéster de coenzima A del ácido graso de cadena acortada (en este caso el miristato de 14 carbonos). El miristil-CoA puede volver a entrar ahora en otra serie de cuatro reacciones de β-oxidación, exactamente análogas a las primeras, para generar una segunda molécula de acetil-CoA y lauril-CoA, el tioéster del coenzima A y el laurato de 12 carbonos. En total se requieren siete pasos a través de la secuencia de la β-oxidación para oxidar una molécula de palmitil-CoA a ocho moléculas de acetil-CoA (Fig. 17–8b). La reacción global es

$$\text{Palmitil-CoA} + 7\text{CoA} + 7\text{FAD} + 7\text{NAD}^+ + 7\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 7\text{FADH}_2 + 7\text{NADH} + 7\text{H}^+ \quad (17\text{–}3)$$

Cada molécula de $FADH_2$ formada durante la oxidación del ácido graso dona un par de electrones a la ETF de la cadena respiratoria y se generan alrededor de 1,5 moléculas de ATP durante la posterior transferencia de cada par de electrones al O_2. De modo similar, cada molécula de NADH formada libera un par de electrones a la NADH deshidrogenasa mitocondrial,

y la posterior transferencia de cada par de electrones al O_2 tiene como resultado la formación de alrededor de 2,5 moléculas de ATP. Así, en cada uno de los pasos a través de la secuencia se forman cuatro moléculas de ATP por cada unidad de dos carbonos eliminada. Obsérvese que en este proceso se produce también agua. La transferencia de electrones desde el NADH o el $FADH_2$ al O_2 da lugar a la formación de un H_2O por cada par de electrones. La reducción del O_2 por el NADH consume también un H^+ por molécula de NADH: $NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O$. En los animales que hibernan, la oxidación de ácidos grasos proporciona energía metabólica, calor y agua, todos ellos esenciales para la supervivencia de un animal que no come ni bebe durante largos períodos de tiempo (Recuadro 17–1). Los camellos obtienen agua para suplementar el escaso suministro disponible en su medio natural a través de la oxidación de grasas almacenadas en sus jorobas.

La ecuación global de la oxidación del palmitil-CoA a ocho moléculas de acetil-CoA, incluyendo la transferencia electrónica y la fosforilación oxidativa, es

$$\text{Palmitil-CoA} + 7\text{CoA} + 7O_2 + 28P_i + 28\text{ADP} \longrightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 28\text{ATP} + 7H_2O \qquad (17\text{–}4)$$

El acetil-CoA puede continuar oxidándose vía ciclo del ácido cítrico

El acetil-CoA producido en la oxidación de los ácidos grasos puede oxidarse a CO_2 y H_2O a través del ciclo del ácido cítrico. La siguiente ecuación representa el balance de la segunda fase de la oxidación del palmitil-CoA, juntamente con las fosforilaciones acopladas de la tercera fase:

$$8\ \text{Acetil-CoA} + 16O_2 + 80P_i + 80\text{ADP} \longrightarrow 8\text{CoA} + 80\text{ATP} + 16CO_2 + 16H_2O \qquad (17\text{–}5)$$

RECUADRO 17–1 Los osos llevan a cabo la β-oxidación durante la hibernación

Muchos animales dependen de sus depósitos de grasa para obtener energía durante la hibernación, durante los períodos migratorios y en otras situaciones en las que se produzcan ajustes metabólicos radicales. Uno de los ajustes más pronunciados del metabolismo lipídico se produce durante la hibernación del oso pardo. Estos animales permanecen en un letargo continuo que puede durar hasta siete meses. A diferencia de la mayoría de especies hibernadoras, el oso mantiene su temperatura corporal entre 32 y 35 °C, cercana a la normal (sin hibernar). A pesar de que consume aproximadamente 25.000 kJ/día (6.000 kcal/día), no come, bebe, orina ni defeca durante meses seguidos.

Estudios experimentales han demostrado que el oso gris en hibernación utiliza únicamente grasa corporal como combustible. La oxidación de grasas proporciona energía suficiente para mantener la temperatura corporal, la síntesis activa de aminoácidos y proteínas y otras actividades que requieren energía, como por ejemplo el transporte a través de membranas. La oxidación de grasas también libera grandes cantidades de agua, tal como se describe en el texto, lo que repone el agua perdida en la respiración. El glicerol liberado en la degradación de los triacilgliceroles se convierte en glucosa sanguínea a través de la gluconeogénesis. La urea formada durante la degradación de aminoácidos es reabsorbida en los riñones y reciclada, siendo utilizados los grupos amino para formar nuevos aminoácidos para mantener las proteínas corporales.

Los osos almacenan una cantidad enorme de grasa corporal en preparación para su largo sueño. Un oso pardo adulto consume unos 38.000 kJ/día durante el final de la primavera y el verano, pero al aproximarse el invierno los osos se alimentan durante 20 horas al día y consumen hasta 84.000 kJ diariamente. Este cambio en la alimentación es una respuesta a un cambio estacional en la secreción hormonal. A partir de la enorme cantidad de glúcidos consumidos durante el período de alimentación intensiva se forman grandes cantidades de triacilgliceroles. Otras especies hibernadoras, entre las que se cuenta el lirón, también acumulan grandes cantidades de grasa corporal.

Un oso pardo prepara su nido de hibernación, cerca del río McNeil en Canadá.

TABLA 17–1 Rendimiento en ATP de la oxidación de una molécula de palmitil-CoA a CO_2 y H_2O

Enzima que cataliza cada paso	Número de NADH o $FADH_2$ formados	Número de ATP formados finalmente*
Acil-CoA deshidrogenasa	7 $FADH_2$	10,5
β-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	7 NADH	17,5
Isocitrato deshidrogenasa	8 NADH	20
α-Cetoglutarato deshidrogenasa	8 NADH	20
Succinil-CoA sintetasa		8†
Succinato deshidrogenasa	8 $FADH_2$	12
Malato deshidrogenasa	8 NADH	20
Total		108

*Estos cálculos suponen que la fosforilación oxidativa mitocondrial produce 1,5 ATP por $FADH_2$ oxidado y 2,5 ATP por NADH oxidado.

†El GTP producido directamente en este paso genera ATP en una reacción catalizada por la nucleósido difosfato quinasa (p. 510).

Combinando las ecuaciones 17–4 y 17–5, obtenemos la ecuación global para la oxidación completa de palmitil-CoA a dióxido de carbono y agua:

$$\text{Palmitoil-CoA} + 23O_2 + 108P_i + 108\text{ADP} \longrightarrow \text{CoA} + 108\text{ATP} + 16CO_2 + 23H_2O \quad (17\text{–}6)$$

En la Tabla 17–1 se resumen los rendimientos de NADH, $FADH_2$ y ATP en los pasos sucesivos de la oxidación del palmitil-CoA. Puesto que la activación del palmitato a palmitil-CoA rompe los dos enlaces anhídrido fosfórico del ATP (Fig. 17–5), el coste energético de la activación de un ácido graso es equivalente a dos ATP y la ganancia neta por molécula de palmitato es de 106 ATP. La variación de energía libre estándar para la oxidación del palmitato a CO_2 y H_2O es de aproximadamente 9.800 kJ/mol. En condiciones estándar se recuperan 106 × 30,5 kJ/mol = 3.230 kJ/mol (aproximadamente el 33% del máximo teórico). Sin embargo, si se calculan las variaciones de energía libre a partir de las concentraciones reales de reactivos y productos en las condiciones intracelulares (véase el Ejemplo práctico 13–2, p. 503), la recuperación de energía libre es de más del 60%; la conservación de energía es notablemente eficiente.

La oxidación de ácidos grasos insaturados requiere dos reacciones adicionales

La secuencia de oxidación de ácidos grasos que acabamos de describir es típica de los ácidos grasos saturados (esto es, que poseen solamente enlaces sencillos en su cadena carbonada). Sin embargo, la mayoría de los ácidos grasos de los triacilgliceroles y de fosfolípidos de animales y plantas son insaturados, es decir, tienen uno o más enlaces dobles.

Estos enlaces se encuentran en la configuración *cis* y no pueden actuar como sustratos de la enoil-CoA hidratasa, el enzima encargado de catalizar la adición de H_2O al doble enlace en trans del Δ^2-enoil-CoA generado durante la β-oxidación. Se necesitan dos enzimas adicionales para la β-oxidación de los ácidos grasos insaturados comunes: una isomerasa y una reductasa. Se ilustrará la función de estas reacciones auxiliares con dos ejemplos.

El oleato es un ácido graso monoinsaturado abundante, de 18 átomos de carbono con un doble enlace en *cis* entre el C-9 y el C-10 (cuya notación es Δ^9). En el primer paso de la oxidación, el oleato se convierte en oleil-CoA, que, al igual que los ácidos grasos saturados, entra en la matriz mitocondrial vía lanzadera de la carnitina (Fig. 17–6). A continuación el oleil-CoA pasa por tres veces a través del ciclo de oxidación de ácidos grasos para generar tres moléculas de acetil-CoA y el éster del coenzima A de un ácido graso insaturado Δ^3 de 12 carbonos, el *cis*-Δ^3-dodecenoil-CoA **(Fig. 17–9)**. Este producto no puede servir como sus-

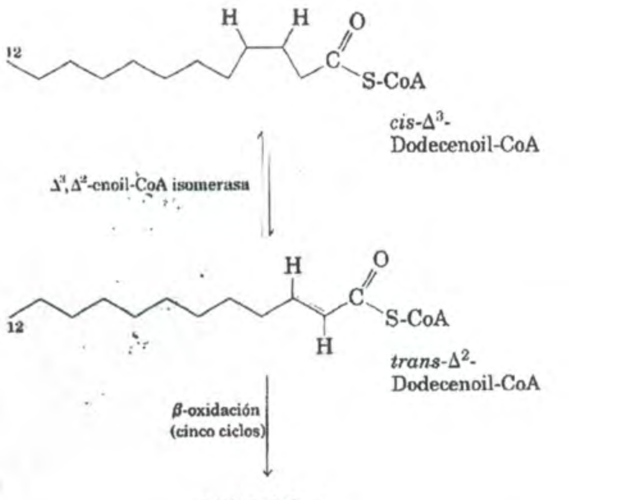


FIGURA 17–9 Oxidación de un ácido graso monoinsaturado. Se muestra como ejemplo el ácido oleico, en forma de oleil-CoA (Δ^9). La oxidación requiere un enzima adicional, la enoil-CoA isomerasa, para reposicionar el doble enlace, convirtiendo el isómero *cis* en *trans*, un intermediario normal de la β-oxidación.

trato para la enoil-CoA hidratasa, que solamente actúa sobre los enlaces dobles en trans. El enzima auxiliar **Δ^3,Δ^2-enoil-CoA isomerasa** isomeriza el *cis*-Δ^3-enoil-CoA para dar lugar a *trans*-Δ^2-enoil-CoA, que es convertido por la enoil-CoA hidratasa en el correspondiente L-β-hidroxiacil-CoA (*trans*-Δ^2-dodecenoil-CoA). Sobre este intermediario actúan ahora los restantes enzimas de la β-oxidación para generar acetil-CoA y el éster del coenzima A de un ácido graso saturado de 10 carbonos, decanil-CoA. Este último sufre cuatro pases más a través de la ruta para dar otras cinco moléculas de acetil-CoA. En total, se producen nueve moléculas de acetil-CoA a partir de una molécula de oleato de 18 carbonos.

El otro enzima auxiliar (en este caso una reductasa) actúa en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, como por ejemplo el linoleato de 18 carbonos, que tiene la configuración *cis*-Δ^9,*cis*-Δ^{12} **(Fig. 17–10)**.

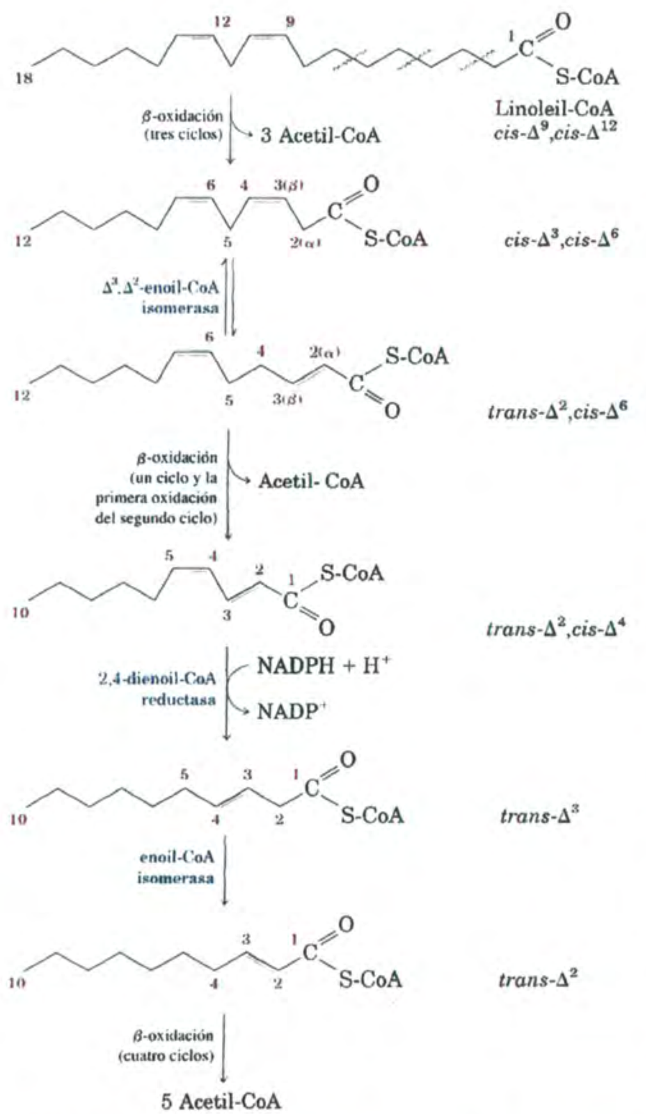


FIGURA 17–10 Oxidación de un ácido graso poliinsaturado. Como ejemplo se muestra el ácido linoleico, en forma de linoleil-CoA ($\Delta^{9,12}$). La oxidación requiere un segundo enzima auxiliar además de la enoil-CoA isomerasa: la 2,4-dienoil-CoA reductasa dependiente de NADPH. La acción combinada de estos dos enzimas convierte un intermediario *trans*-Δ^2,*cis*-Δ^4-dienoil-CoA en el sustrato *trans*-Δ^2-enoil-CoA necesario para la β-oxidación.

El linoleil-CoA pasa por tres veces a través de la secuencia de la β-oxidación y genera tres moléculas de acetil-CoA y el éster del coenzima A de un ácido graso insaturado de 12 carbonos con configuración *cis*-Δ^3, *cis*-Δ^6. Este intermediario no puede ser utilizado por los enzimas de la ruta de la β-oxidación; sus enlaces dobles se encuentran en posición y configuración inadecuadas (*cis* y no *trans*). Sin embargo, la acción combinada de la enoil-CoA isomerasa y de la **2,4-dienoil-CoA reductasa** (Fig. 17–10) permite la reentrada de este intermediario en la ruta normal de la β-oxidación y su degradación a seis acetil-CoA. El resultado global es la conversión del linoleato en nueve moléculas de acetil-CoA.

La oxidación completa de ácidos grasos de cadena impar requiere tres reacciones adicionales

A pesar de que la mayoría de lípidos naturales contienen ácidos grasos con número par de átomos de carbono, los ácidos grasos de número impar de carbonos son comunes en los lípidos de muchas plantas y algunos organismos marinos. El ganado bovino y otros rumiantes producen gran cantidad de **propionato** (CH_3—CH_2—COO^-) de tres carbonos durante la fermentación de los glúcidos en el rumen. El propionato así formado se absorbe en la sangre y es oxidado en el hígado y otros tejidos. También se añaden pequeñas cantidades de propionato como inhibidor de hongos al pan y a los cereales, de modo que entra en la dieta humana.

Los ácidos grasos de cadena larga e impar se oxidan a través de la misma ruta que los ácidos de número par de átomos de carbono, empezando por el extremo carboxilo de la cadena. Sin embargo, el sustrato del último paso a través de la secuencia de la β-oxidación es un acil graso-CoA en el que el ácido graso tiene cinco átomos de carbono. Cuando éste sufre la oxidación y rotura, los productos son acetil-CoA y **propionil-CoA.** El acetil-CoA puede oxidarse a través del ciclo del ácido cítrico, pero el propionil-CoA entra en una ruta enzimática diferente en la que participan tres enzimas.

En primer lugar, el propionil-CoA se carboxila para dar lugar al estereoisómero D del **metilmalonil-CoA (Fig. 17–11)** por acción de la **propionil-CoA carboxilasa,** que contiene biotina como cofactor. En esta reacción enzimática, al igual que en la reacción de la piruvato carboxilasa (véase la Fig. 16–16), el CO_2 (o su ión hidratado, HCO_3^-) se activa por unión a la biotina antes de ser transferido al sustrato, en este caso el propionato. La formación del intermedio carboxibiotina requiere energía, que es proporcionada por la hidrólisis de ATP a ADP y P_i. El D-metilmalonil-CoA así formado se epimeriza enzimáticamente a su estereoisómero L por acción de la **metilmalomil-CoA epimerasa** (Fig. 17–11). El L–metilmalonil-CoA experimenta entonces una reestructuración intramolecular para formar succinil-CoA, que puede entrar en el ciclo del ácido cítrico. Esta reestructuración está catalizada por la **metilmalonil-CoA mutasa,** que requiere como coenzima **5′-desoxiadenosil-cobalamina** o **coenzima B_{12}**, derivado de la vitamina B_{12} (cobalamina). El Recuadro 17–2 describe el papel del coenzima B_{12} en esta notable reacción de intercambio.

RECUADRO 17-2 Coenzima B_{12}: una solución radical a un problema desconcertante

En la reacción de la metilmalonil-CoA mutasa (véase la Fig. 17–11), el grupo —CO—S-CoA en C-2 del propionato original cambia su posición con un átomo de hidrógeno en el C-3 del propionato original (Fig. 1a). El coenzima B_{12} es el cofactor de esta reacción, y también lo es de la mayoría de enzimas que catalizan reacciones de este tipo general (Fig. 1b). Estos procesos dependientes del coenzima B_{12} se cuentan entre las pocas reacciones enzimáticas en biología en las que se produce el intercambio de un grupo alquilo o de un grupo alquilo sustituido (X) con un átomo de hidrógeno de un carbono adyacente, *sin que se produzca intercambio entre el átomo de hidrógeno transferido y el hidrógeno del disolvente*, H_2O. ¿Cómo es posible que el átomo de hidrógeno se traslade de un carbono a otro sin mezclarse con el enorme exceso de átomos de hidrógeno del disolvente?

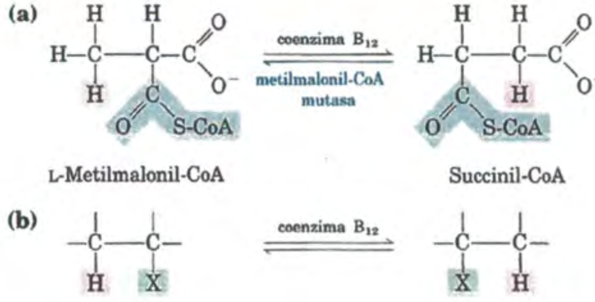


FIGURA 1

El coenzima B_{12} es la forma cofactor de la vitamina B_{12}, la única de las vitaminas que contiene, además de una molécula orgánica compleja, un oligoelemento esencial, el cobalto. El complejo **sistema anular de corrina** de la vitamina B_{12} (en color azul en la Fig. 2), en el que se coordina el cobalto (en su forma Co^{3+}), está relacionado químicamente con el sistema anular de porfirina del grupo hemo y de las hemoproteínas (véase la Fig. 5–1). Una quinta posición de coordinación del cobalto está ocupada por el dimetilbencimidazol ribonucleótido (sombreado en amarillo), unido covalentemente por su grupo fosfato en 3′ a una de las cadenas laterales del anillo de corrina a través de un aminoisopropanol. La formación de este cofactor complejo se produce en una de las dos reacciones conocidas en las que se escinde trifosfato del ATP (Fig. 3); la otra es la formación de *S*-adenosilmetionina a partir de ATP y metionina (véase la Fig. 18–18).

La vitamina B_{12} se suele aislar en forma de **cianocobalamina,** que contiene un grupo ciano (adquirido durante el proceso de purificación) unido al cobalto en su sexta posición de coordinación. En la **5′-desoxiadenosilcobalamina,** el cofactor de la metilmalonil-CoA mutasa, el grupo ciano está sustituido por el grupo **5′-desoxiadenosilo** (en rojo en la Fig. 2), unido covalentemente al cobalto a través del C-5′. Su estructura tridimensional fue determinada por Dorothy Crowfoot Hodgkin en 1956, mediante cristalografía de rayos X.

Dorothy Crowfoot Hodgkin, 1910–1994

La clave para comprender el modo en que el coenzima B_{12} cataliza el intercambio de hidrógeno reside en las propiedades del enlace covalente entre el cobalto y el C-5′ del grupo desoxiadenosilo (Fig. 2). Este enlace es relativamente débil; su energía de disociación es de aproximadamente 110 kJ/mol, en comparación con los 348 kJ/mol de un enlace C—C típico o los 414 kJ/mol de un enlace C—H. La simple iluminación del compuesto con luz visible es capaz de romper este enlace Co–C. (Esta extrema fotolabilidad es probablemente la razón de que las plantas no contengan vitamina B_{12}.) La disociación produce un radical 5′-desoxiadenosilo y la forma Co^{2+} de la vitamina. La función química de la 5′-desoxiadenosilcobalamina es la de generar radicales libres de la manera descrita, con lo que se inicia una serie de transformaciones como las ilustradas en la Figura 4, donde se muestra un mecanismo postulado para la reacción catalizada por la

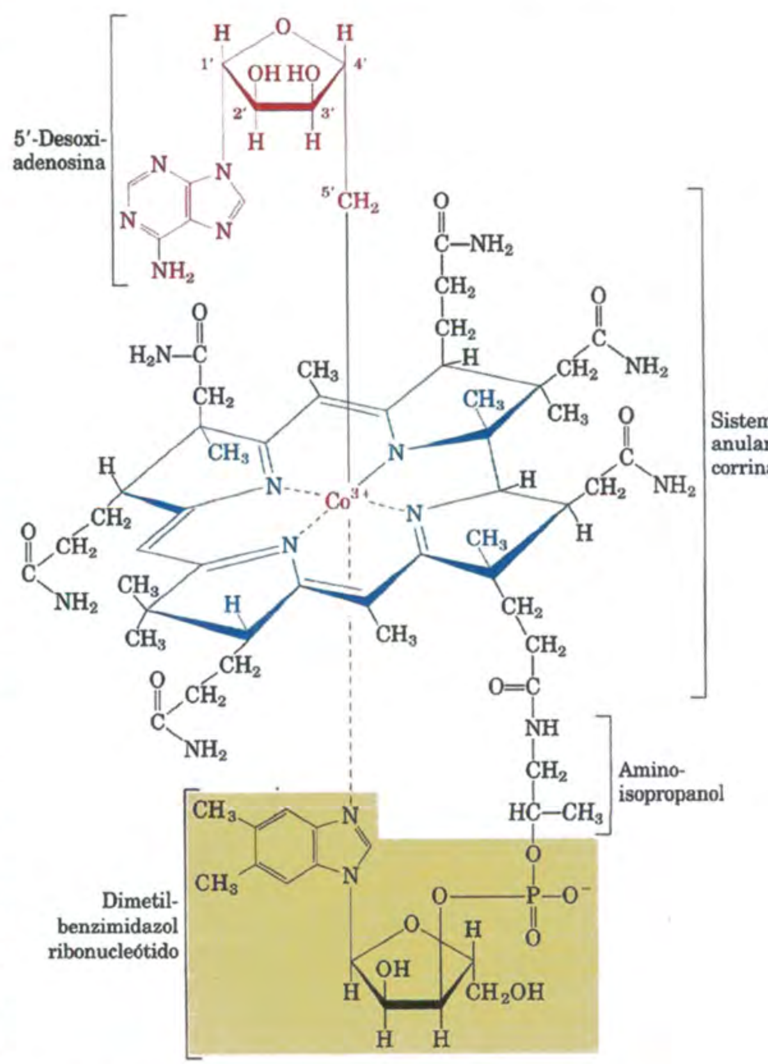


FIGURA 2

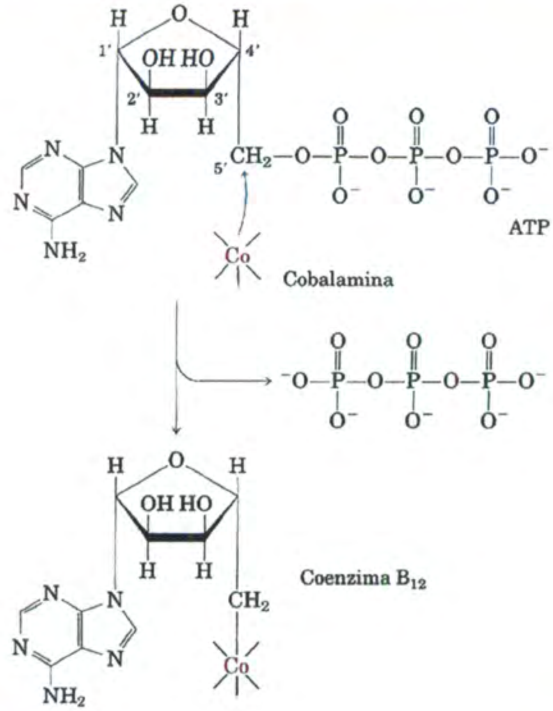


FIGURA 3

metilmalonil-CoA mutasa y otras transformaciones dependientes del coenzima B_{12}. En este mecanismo propuesto, el átomo de hidrógeno que migra no existe nunca en forma libre ni está por tanto posibilitado para intercambiarse libremente con el hidrógeno de las moléculas de agua circundantes.

La carencia de vitamina B_{12} provoca la aparición de una grave enfermedad. Esta vitamina no se sintetiza ni en plantas ni en animales y sólo pueden sintetizarla unas pocas especies de microorganismos. Las necesidades de la vitamina son muy bajas, de unos 3 μg/día, en las personas sanas. La grave enfermedad denominada **anemia perniciosa** resulta de la incapacidad de absorber de forma eficiente la vitamina B_{12} desde el intestino, donde es sintetizada por las bacterias intestinales o bien obtenida a partir de la ingestión de carne. Los individuos que sufren esta enfermedad no producen una cantidad suficiente de **factor intrínseco,** una glucoproteína esencial para la absorción de la vitamina B_{12}. La patología de la anemia perniciosa incluye una disminución en la producción de eritrocitos, bajos niveles de hemoglobina y un grave y progresivo deterioro del sistema nervioso central. En algunos casos, la administración de grandes dosis de vitamina B_{12} alivia estos síntomas. ■

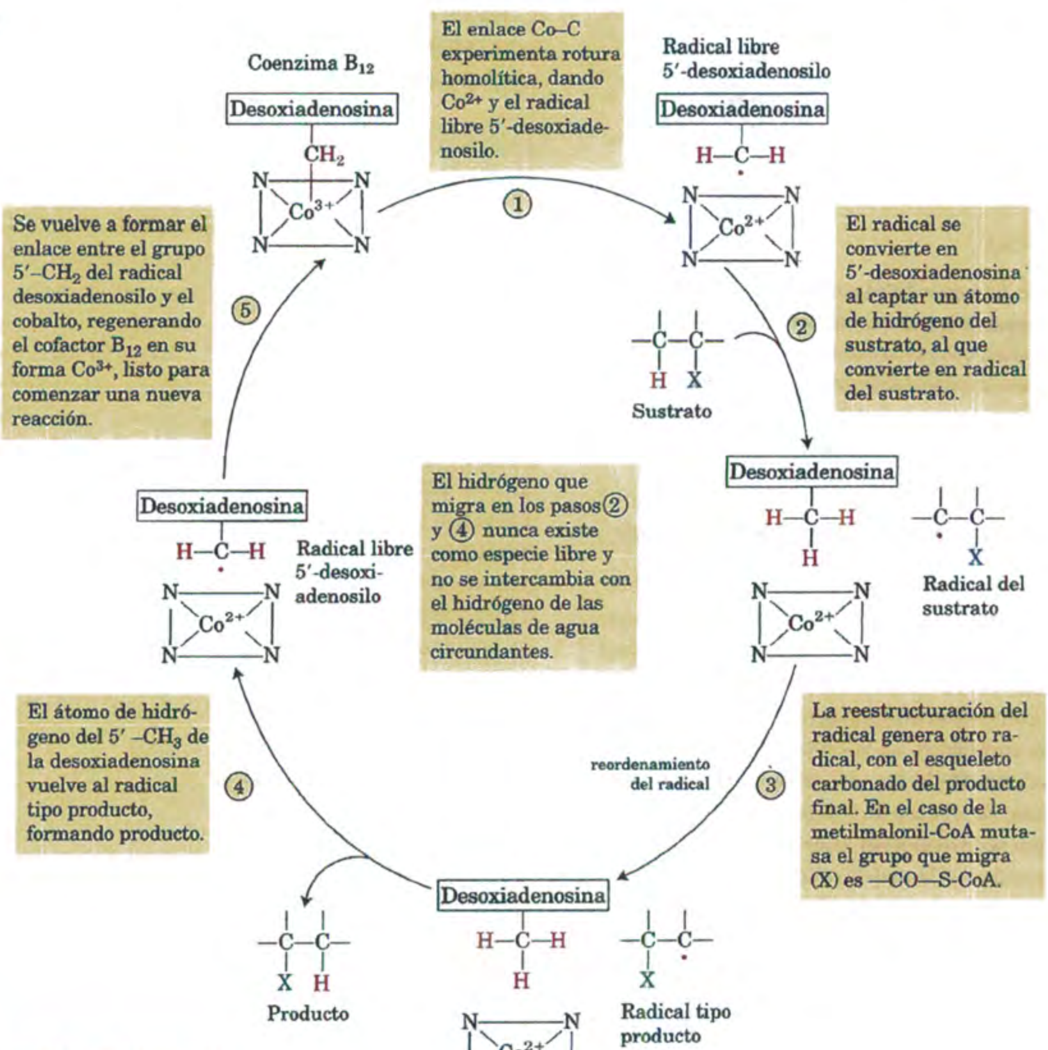


FIGURA DE MECANISMO 4

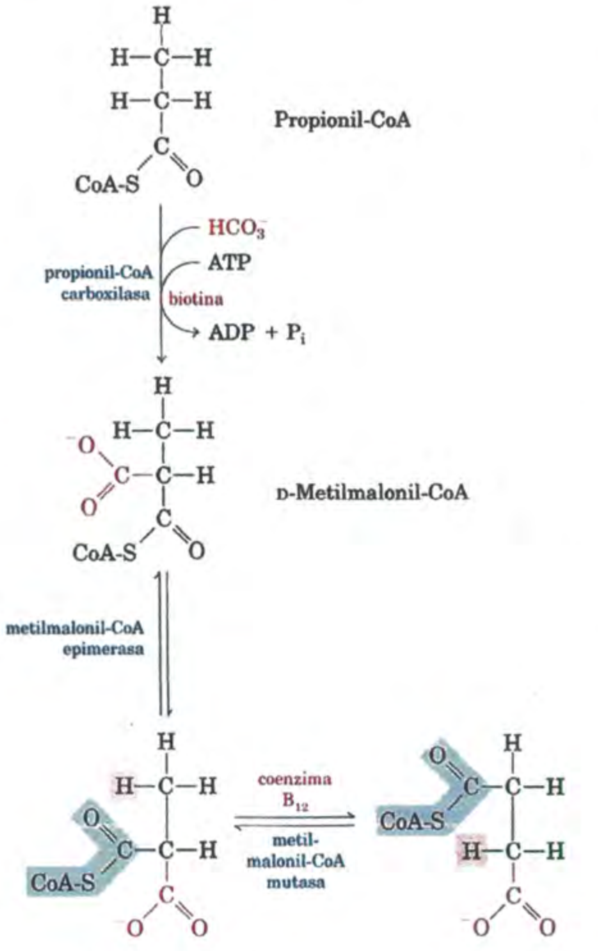
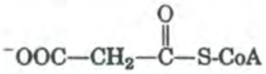


FIGURA 17–11 Oxidación del propionil–CoA producido en la β-oxidación de ácidos grasos de cadena impar. En la secuencia interviene la carboxilación del propionil-CoA a D-metilmalonil-CoA y la conversión de este último en succinil-CoA. Esta conversión requiere la epimerización desde D- a L-metilmalonil-CoA, seguida por una extraordinaria reacción en la que los sustituyentes de carbonos adyacentes cambian sus posiciones (véase el Recuadro 17–2).

La oxidación de ácidos grasos está estrictamente regulada

La oxidación de los ácidos grasos consume un combustible precioso, y sólo tiene lugar cuando la necesidad de energía lo requiere. En el hígado, el acil graso–CoA formado en el citosol puede seguir dos rutas: (1) β-oxidación a cargo de enzimas mitocondriales o (2) conversión en triacilgliceroles y fosfolípidos a cargo de enzimas citosólicos. La vía escogida depende de la velocidad de transferencia de los acil graso–CoA de cadena larga a la mitocondria. El proceso de tres pasos (lanzadera de la carnitina) por el que se transportan grupos acilo grasos de los acil graso–CoA citosólicos a la matriz mitocondrial (Fig. 17–6) constituye el paso limitante de la velocidad de oxidación de ácidos grasos, y es un punto de regulación importante. Una vez los grupos acilo grasos han entrado en la mitocondria siguen obligatoriamente el proceso de oxidación hasta acetil-CoA.

La concentración de **malonil-CoA,** el primer intermediario de la biosíntesis citosólica de ácidos grasos de cadena larga a partir de acetil-CoA (véase la Fig. 21–1), aumenta siempre que el animal recibe un suministro abundante de glúcidos; el exceso de glucosa que no puede oxidarse o almacenarse en forma de glucógeno se convierte en ácidos grasos en el citosol para su almacenamiento como triacilgliceroles. La inhibición de la carnitina aciltransferasa I por el malonil-CoA garantiza la inhibición de la oxidación de ácidos grasos siempre que el hígado reciba un suministro abundante de glucosa como combustible y fabrique activamente triacilgliceroles a partir del exceso de glucosa.



Malonil-CoA

Dos de los enzimas de la β-oxidación también están regulados por metabolitos que señalan que existe energía suficiente. Cuando la relación [NADH]/[NAD$^+$] es elevada, la β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa está inhibida; además, concentraciones elevadas de acetil-CoA inhiben la tiolasa **(Fig. 17–12)**.

Recuerde del Capítulo 15 que durante los períodos de contracción muscular vigorosa o durante el ayuno, el descenso de la [ATP] y el aumento de la [AMP] activan la AMPK, la proteína quinasa activada por AMP. La AMPK fosforila diversos enzimas diana, entre ellos la acetil-CoA carboxilasa, que cataliza la síntesis de malonil-CoA. Esta fosforilación y, en consecuencia, la inhibición de la acetil-CoA carboxilasa disminuye la concentración de malonil-CoA y elimina la inhibición del transporte de acil graso–carnitina a la mitocondria (Fig. 17–12) lo que permite que la β-oxidación reponga el suministro de ATP.

La síntesis de proteínas para el catabolismo lipídico es activada por factores de transcripción

Además de los diferentes mecanismos reguladores a corto plazo que modulan la actividad de los enzimas existentes, la regulación de la transcripción puede cambiar el número de moléculas de los enzimas de la oxidación de los ácidos grasos en una escala de tiempo que va de minutos a horas. La familia **PPAR** de receptores nucleares son factores de transcripción que afectan muchos procesos metabólicos en respuesta a diversos ligandos tipo ácido graso. (Originalmente se reconocieron como *r*eceptores de *p*eroxisomas *a*ctivados por *p*roliferador, pero más tarde se encontró que tenían una función más amplia). el PPARα actúa en el músculo, tejido adiposo e hígado sobre un conjunto de genes esencial para la oxidación de ácidos grasos entre los que se cuentan el transportador de ácidos grasos, las carnitina aciltransferasas I y II, las acil graso–CoA deshidrogenasas para cadenas acilo cortas, medianas, largas y muy largas y los enzimas relacionados. Esta respuesta se desencadena cuando una célula o un organismo presenta una demanda superior de energía del catabolismo de las grasas, tal como sucede durante un ayuno entre comidas o en condiciones de inanición prolongada. El glucagón, liberado en respuesta a una baja glucosa sanguínea, puede actuar a través del cAMP y el factor de transcripción CREB para activar ciertos genes que intervienen en el catabolismo lipídico.

Otra situación acompañada de cambios en la expresión de los enzimas de la oxidación de ácidos grasos es la transición del metabolismo fetal al neonatal en el corazón. En el feto los combustibles principales son la glucosa y el lactato, pero en el corazón neonatal los ácidos grasos constituyen el combustible principal. En el momento de esta transición, se activa el PPARα que, a su vez, activa los genes esenciales para el meta-

FIGURA 17–12 Regulación coordinada de la síntesis y degradación de ácidos grasos. Cuando la dieta proporciona una fuente fácilmente disponible de glúcido como combustible, la β-oxidación de los ácidos grasos no es necesaria y está inhibida. Para la coordinación del metabolismo de los ácidos grasos son claves dos enzimas: la acetil-CoA carboxilasa (ACC), primer enzima de la síntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21–1), y la carnitina aciltransferasa I, que limita el transporte de ácidos grasos al interior de la matriz mitocondrial para la β-oxidación (véase la Fig. 17–6). La ingestión de una comida rica en glúcidos aumenta el nivel sanguíneo de glucosa y ① desencadena la liberación de insulina. ② La proteína fosfatasa dependiente de insulina desfosforila la ACC, activándola. ③ La ACC cataliza la formación de malonil-CoA (el primer intermediario de la síntesis de ácidos grasos) y ④ el malonil-CoA inhibe la carnitina aciltransferasa I, impidiendo así la entrada de ácidos grasos a la matriz mitocondrial.

Cuando disminuyen los niveles sanguíneos de glucosa entre las comidas, ⑤ la liberación de glucagón activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) que ⑥ fosforila e inactiva la ACC. La concentración de malonil-CoA desciende, la inhibición de la entrada de ácidos grasos en la mitocondria disminuye y ⑦ los ácidos grasos entran a la matriz mitocondrial y ⑧ se convierten en combustible. Dado que el glucagón desencadena la movilización de ácidos grasos en el tejido adiposo, llega a la sangre un suministro de éstos.

bolismo de los ácidos grasos. Tal como veremos en el Capítulo 23, hay otros dos factores de transcripción de la familia PPAR que también juegan papeles cruciales en la adopción de los complementos enzimáticos (y por consiguiente las actividades metabólicas) de tejidos específicos en momentos determinados (véase la Fig. 23–42).

El sitio principal de la oxidación de ácidos grasos, tanto durante el descanso como durante el ejercicio, es el músculo esquelético. El entrenamiento de fondo aumenta la expresión de PPARα en el músculo, lo que comporta un aumento en los niveles de los enzimas de oxidación de ácidos grasos y un aumento en la capacidad oxidante del músculo.

Defectos genéticos de las acil graso-CoA deshidrogenasas producen enfermedades graves

Los triacilgliceroles almacenados constituyen habitualmente la principal fuente de energía para la contracción muscular, por lo que la incapacidad de oxidar ácidos grasos de los triacilgliceroles tiene consecuencias graves para la salud. El defecto genético más frecuente del catabolismo de los ácidos grasos en las poblaciones de Estados Unidos y del norte de Europa se debe a una mutación en el gen que codifica la **acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD).** Entre los europeos del norte la frecuencia de portadores (individuos con la mutación recesiva en uno de los dos cromosomas homólogos) es de alrededor de 1 en 40, y aproximadamente 1 individuo de cada 10.000 sufre la enfermedad, es decir, tiene dos copias del alelo MCAD mutante, con lo que no puede oxidar ácidos grasos de 6 a 12 carbonos. La enfermedad se caracteriza por episodios recurrentes de un síndrome que incluye la acumulación de grasa en el hígado, niveles sanguíneos elevados de ácido octanoico, baja glucosa sanguínea (hipoglucemia), somnolencia, vómito y coma. El patrón de ácidos orgánicos en la orina ayuda a diagnosticar la enfermedad: normalmente la orina contiene altas concentraciones de ácidos dicarboxílicos de 6 a 10 carbonos (producidos por ω-oxidación) y bajas concentraciones de cuerpos cetónicos (se discuten la ω-oxidación y los cuerpos cetónicos en la Sección 17.3.) Aunque los individuos pueden carecer de síntomas entre episodios, éstos son muy graves; la mortalidad de esta enfermedad es entre el 25% y el 60% en la infancia. Si se detecta el defecto genético tempranamente poco después del nacimiento, se puede empezar a alimentar al bebé con una dieta baja en grasa y rica en glúcidos. Con la detección temprana y un control cuidadoso de la dieta (entre los que se incluye evitar intervalos largos entre comidas para impedir que el cuerpo movilice sus reservas grasas para la obtención de energía), el pronóstico para estos individuos es bueno.

Se han descrito más de 20 defectos genéticos humanos en el transporte u oxidación de ácidos grasos, la mayoría mucho menos frecuentes que el defecto de la MCAD. Una de las enfermedades más graves es la que es debida a la pérdida de la actividad β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga de la proteína trifuncional, TFP. Otras enfermedades son debidas a defectos en las subunidades α o β que afectan a las tres actividades de la TFP que dan lugar a enfermedad cardíaca grave y a músculo esquelético anormal. ■

Los peroxisomas también llevan a cabo la β-oxidación

A pesar de que el sitio principal donde se lleva a cabo la oxidación de ácidos grasos en las células animales es la matriz mitocondrial, también otros compartimientos celulares contienen los enzimas capaces de oxidar ácidos grasos a acetil-CoA a través de una ruta similar, aunque no idéntica, a la de la mitocondria. En las células vegetales el sitio principal de la β-oxidación no son las mitocondrias sino los peroxisomas.

En los **peroxisomas,** orgánulos celulares rodeados de membrana presentes en células animales y vegetales, los intermediarios de la β-oxidación de los ácidos grasos son derivados del coenzima A, y el proceso consta de cuatro pasos, al igual que en la β-oxidación mitocondrial **(Fig. 17–13)**: (1) deshidrogenación, (2) adición de agua al doble enlace resultante, (3) oxidación del β-hidroxiacil-CoA a una cetona y (4) rotura tiolítica a cargo del coenzima A. (Como se verá a continuación, en los glioxisomas tienen lugar idénticas reacciones.)

Una diferencia entre las rutas peroxisómica y mitocondrial radica en la química del primer paso. En los peroxisomas, la flavoproteína acil-CoA oxidasa que introduce el doble enlace pasa los electrones directamente al O_2, formando H_2O_2 (Fig. 17–13). Este oxidante fuerte y potencialmente peligroso se transforma inmediatamente en H_2O y O_2 por la **catalasa.** Recuerde que en la mitocondria, en cambio, los electrones eliminados en el primer paso de la oxidación pasan a través de la cadena respiratoria hacia el O_2 para producir H_2O, y que este proceso está acompañado de síntesis de ATP. En los peroxisomas, la energía liberada en el primer paso de la oxidación de ácidos grasos no se conserva como ATP, sino que se disipa en forma de calor.

Una segunda diferencia importante entre la β-oxidación mitocondrial y la peroxisómica en los mamíferos reside en la especificidad respecto a los acil graso–CoA; el sistema peroxisómico es mucho más activo sobre los ácidos grasos de cadena muy larga tales como el ácido hexacosanoico (26:0) y sobre ácidos grasos ramificados tales como el ácido fitánico y el ácido pristánico (véase la Fig. 17–17). Estos ácidos grasos menos frecuentes se obtienen en la dieta a partir de productos lácteos, la grasa de rumiantes, carne y pescado. Su catabolismo en el peroxisoma requiere varios enzimas auxiliares característicos de este orgánulo. La incapacidad para oxidar estos compuestos es la responsable de varias enfermedades humanas graves. Los individuos con el **síndrome de Zellweger** no pueden fabricar peroxisomas, por lo que carecen de todo el metabolismo propio de este orgánulo. En la **adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (XALD),** los peroxisomas no pueden oxidar ácidos grasos de cadena muy larga, parece que debido a la falta de un transportador funcional de estos ácidos grasos en la membrana peroxisómica. Ambos defectos llevan a la acumulación en la sangre de ácidos grasos de cadena muy larga, especialmente el 26:0. La XALD afecta a chicos jóvenes de menos de 10 años; produce la pérdida de visión, alteraciones del comportamiento y muerte en unos pocos años. ■

Un nivel elevado de grasa en la dieta de un mamífero produce un aumento en la síntesis de enzimas de la β-oxidación peroxisómica en el hígado. Los peroxisomas del hígado no contienen los enzimas del ciclo del ácido cítrico y no pueden catalizar la oxidación del acetil-CoA a CO_2. En su lugar, los ácidos grasos de cadena larga o ramificados se catabolizan a productos de cadena más corta, tales como el hexanil-CoA, y se exportan a las mitocondrias para ser oxidados completamente.

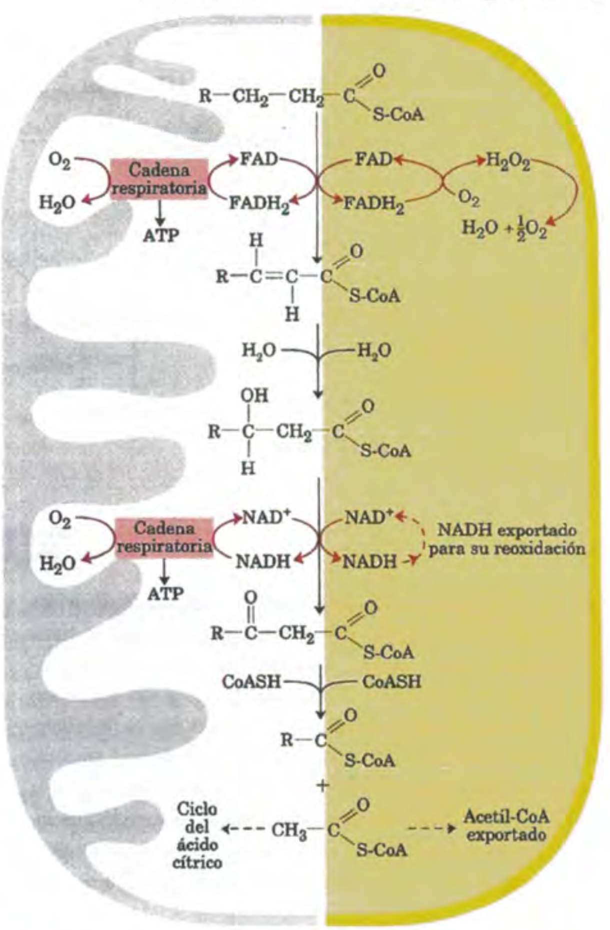


FIGURA 17–13 Comparación de la β-oxidación en mitocondrias y en peroxisomas y glioxisomas. El sistema peroxisómico/glioxisómico difiere del sistema mitocondrial en dos aspectos: (1) en el primer paso oxidativo, los electrones pasan directamente al O_2, generando H_2O_2, y (2) el NADH formado en el segundo paso oxidativo no puede ser reoxidado, de forma que los equivalentes de reducción se exportan desde el peroxisoma al citosol, pasando finalmente a la mitocondria. El acetil-CoA producido por los peroxisomas y glioxisomas también se exporta; el acetato de los glioxisomas (orgánulos que se encuentran sólo en las semillas en germinación) se utiliza como precursor biosintético (véase la Fig. 17–14). En las mitocondrias, el acetil-CoA producido sigue oxidándose en el ciclo del ácido cítrico.

Los peroxisomas y glioxisomas de las plantas utilizan acetil-CoA procedente de la β-oxidación como precursor biosintético

La oxidación de ácidos grasos en plantas no tiene lugar principalmente en las mitocondrias (tal como ya se dijo), sino en los peroxisomas del tejido de las hojas y en los glioxisomas de las semillas en germinación. Los peroxisomas y glioxisomas de las plantas tienen una estructura y función similares. Los glioxisomas que sólo están presentes en las semillas en germinación se consideran peroxisomas especializados. La función biológica de la β-oxidación en estos orgánulos es proporcionar precursores biosintéticos a partir de lípidos almacenados, no energía.

Durante la germinación de las semillas, los triacilgliceroles almacenados se convierten en glucosa, sacarosa y una amplia variedad de metabolitos esenciales **(Fig. 17–14)**. Los ácidos grasos que se liberan a partir de los triacilgliceroles se activan primero formando sus derivados de coenzima A y se oxidan en los glioxisomas siguiendo el mismo proceso en cuatro pasos que tiene lugar en los peroxisomas (Fig. 17–13). El acetil-CoA producido se convierte en precursores de cuatro carbonos para la gluconeogénesis (véase la Fig. 14–19) a través del ciclo del glioxilato (véase la Fig. 16–20). Los glioxisomas, al igual que los peroxisomas, contienen elevadas concentraciones de catalasa, que convierte el H_2O_2 producido por la β-oxidación en H_2O y O_2.

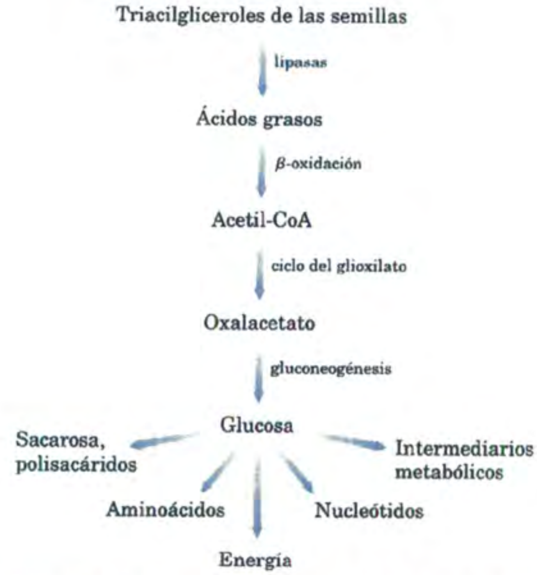


FIGURA 17–14 Los triacilgliceroles como fuente de glucosa en las semillas. La β-oxidación es una fase de una ruta que convierte los triacilgliceroles almacenados en glucosa, durante la germinación de las semillas. Para más detalles véase la Figura 16–22.

Los enzimas de la β-oxidación de diferentes orgánulos han tenido una evolución divergente

A pesar de que las reacciones de la β-oxidación en mitocondrias son esencialmente las mismas que las de los peroxisomas y glioxisomas, los enzimas (isozimas) son significativamente diferentes entre estos dos tipos de orgánulos. Estas diferencias son probablemente el reflejo de una divergencia evolutiva que se produjo muy pronto, durante la separación de las bacterias gram-positivas y gram-negativas (véase la Fig. 1–6).

En las mitocondrias, cada uno de los cuatro enzimas de la β-oxidación que actúan sobre los acil graso–CoA de cadena corta son proteínas individuales y solubles (tal como ya se dijo), de estructura similar a los enzimas análogos presentes en bacterias gram-positivas **(Fig. 17–15a)**. Las bacterias gram-negativas tienen cuatro actividades en tres subunidades solubles (Fig. 17–15b) y el sistema enzimático de los eucariotas que actúa sobre ácidos grasos de cadena larga —la proteína trifuncional, TFP— tiene tres actividades enzimáticas en dos subunidades asociadas a membrana (Fig. 17–15c).

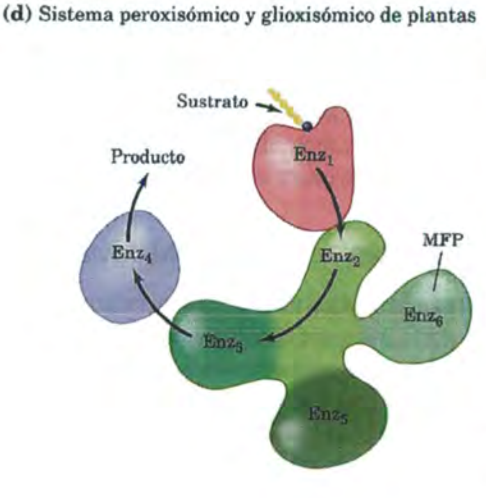


FIGURA 17–15 Los enzimas de la β-oxidación. Aquí se muestran las diferentes estructuras de subunidades de los enzimas de la β-oxidación en bacterias gram-positivas y gram-negativas, mitocondrias, y peroxisomas y glioxisomas vegetales. Enz_1 es la acil-CoA deshidrogenasa; Enz_2, la enoil-CoA hidratasa; Enz_3, la L-β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; Enz_4, la tiolasa; Enz_5, la D-3-hidroxiacil-CoA epimerasa, y Enz_6, la Δ^3,Δ^2-enoil-CoA isomerasa. **(a)** Los cuatro enzimas de la β-oxidación en bacterias gram-positivas son entidades solubles y separadas, al igual que el sistema mitocondrial específico para cadena corta. **(b)** En las bacterias gram-negativas, las cuatro actividades enzimáticas residen en tres polipéptidos; Enz_2 y Enz_3 forman parte de una cadena polipeptídica sencilla. **(c)** El sistema mitocondrial específico para cadena muy larga también se compone de tres polipéptidos, uno de los cuales contiene las actividades de los enzimas Enz_2 y Enz_3; en este caso, el sistema está unido a la membrana mitocondrial interna. **(d)** En los sistemas de la β-oxidación peroxisómico y glioxisómico de plantas, los enzimas Enz_1 y Enz_4 son polipéptidos separados, mientras que los enzimas Enz_2 y Enz_3, así como dos enzimas auxiliares (Enz_5 y Enz_6), forman parte de una única cadena polipeptídica, la proteína multifuncional MFP.

Sin embargo, los enzimas de la β-oxidación de los peroxisomas y glioxisomas de plantas forman un complejo de proteínas, una de las cuales contiene cuatro actividades enzimáticas en una única cadena polipeptídica (Fig. 17–15d). El primer enzima, la acil-CoA oxidasa, es una cadena polipeptídica sencilla; la **proteína multifuncional (MFP)** contiene la segunda y tercera actividades enzimáticas (enoil-CoA hidratasa e hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), así como dos actividades auxiliares necesarias para la oxidación de ácidos grasos insaturados (D-3-hidroxiacil-CoA epimerasa y Δ^3,Δ^2-enoil-CoA isomerasa); el cuarto enzima, la tiolasa, es un polipétido soluble diferente.

Es interesante observar que los enzimas que catalizan esencialmente el inverso de la β-oxidación en la síntesis de ácidos grasos también están organizados de manera diferente en bacterias y eucariotas; en las bacterias, los siete enzimas necesarios para la síntesis de ácidos grasos son polipéptidos separados, mientras que en los mamíferos las siete actividades forman parte de una única cadena polipeptídica enorme. Una ventaja para la célula de tener varios enzimas de la misma ruta codificados en un única cadena polipeptídica es que esto resuelve el problema de regular la síntesis de enzimas que han de interaccionar funcionalmente; la regulación de la expresión de *un* gen asegura la producción del mismo número de sitios activos de todos los enzimas de la vía. Cuando cada actividad enzimática se encuentra en un polipéptido diferente, se requiere algún mecanismo que coordine la síntesis de todos los productos génicos. La *desventaja* de tener varias actividades en la misma cadena polipeptídica es que cuanto más larga sea la cadena polipeptídica mayor será la posibilidad de algún error en su síntesis: un solo aminoácido incorrecto en la cadena puede hacer que todas las actividades enzimáticas en aquella cadena sean inservibles. La comparación de las estructuras génicas de estas proteínas en muchas especies puede aportar alguna luz sobre las razones para la selección de una u otra estrategia durante la evolución.

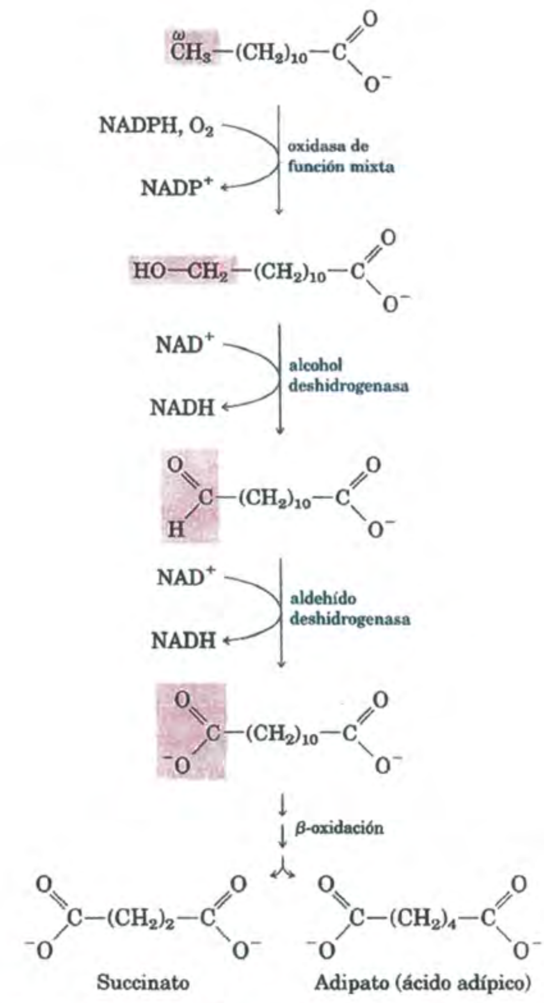


FIGURA 17–16 **ω-Oxidación de ácidos grasos en el retículo endoplasmático.** Esta alternativa a la β-oxidación se inicia con la oxidación del carbono más alejado del carbono α el carbono ω (omega). El sustrato es normalmente un ácido graso de cadena media; aquí se muestra el ácido láurico (laurato). Esta ruta no es, generalmente, la ruta principal del catabolismo oxidativo de los ácidos grasos.

En el retículo endoplasmático tiene lugar la ω-oxidación de los ácidos grasos

Aunque la β-oxidación mitocondrial, en la que los enzimas actúan sobre el extremo carboxílico de un ácido graso, es de lejos el destino catabólico más importante para los ácidos grasos en las células animales, en algunas especies, incluidos los vertebrados, existe otra ruta que implica la oxidación del carbono ω (omega), el carbono más distante del grupo carboxílico. Los enzimas exclusivos de la **ω-oxidación** están localizados en los vertebrados en el retículo endoplasmático del hígado y riñón, y los sustratos preferidos son los ácidos grasos de 10 o 12 átomos de carbono. En los mamíferos la ω-oxidación es normalmente una ruta minoritaria para la degradación de ácidos grasos, pero cuando la β-oxidación es defectuosa (debido a una mutación o a la deficiencia de carnitina, por ejemplo), se hace más importante.

El primer paso introduce un grupo hidroxilo en el carbono ω **(Fig. 17–16)**. El oxígeno para este grupo proviene de oxígeno molecular (O_2) a través de una reacción compleja en la que interviene el citocromo P450 y el dador de electrones NADPH. Las reacciones de este tipo están catalizadas por **oxidasas de función mixta,** descritas en el Recuadro 21–1. Otros dos enzimas actúan a continuación sobre el carbono ω: la **alcohol deshidrogenasa** oxida el grupo hidroxilo a un aldehído, y la **aldehído deshidrogenasa** oxida el grupo aldehído a un ácido carboxílico, produciendo un ácido graso con un grupo carboxílico en cada extremo. En este punto, cualquiera de los dos extremos puede unirse al coenzima A, y la molécula puede entrar en la mitocondria y experimentar la β-oxidación por la ruta normal. En cada pase a través de la ruta de la β-oxidación, el ácido graso con "doble extremo" produce ácidos dicarboxílicos tales como los ácidos succínico y adípico (Fig. 17–16).

El ácido fitánico experimenta α-oxidación en los peroxisomas

La presencia de un grupo metilo sobre el carbono β de un ácido graso hace que la β-oxidación sea imposible, por lo que estos ácidos grasos ramificados son catabolizados en los peroxisomas de células animales mediante la **α-oxidación.** En la oxidación del ácido fitánico **(Fig. 17–17)**, el fitanil-CoA se hidroxila en su carbono β, en una reacción en la que

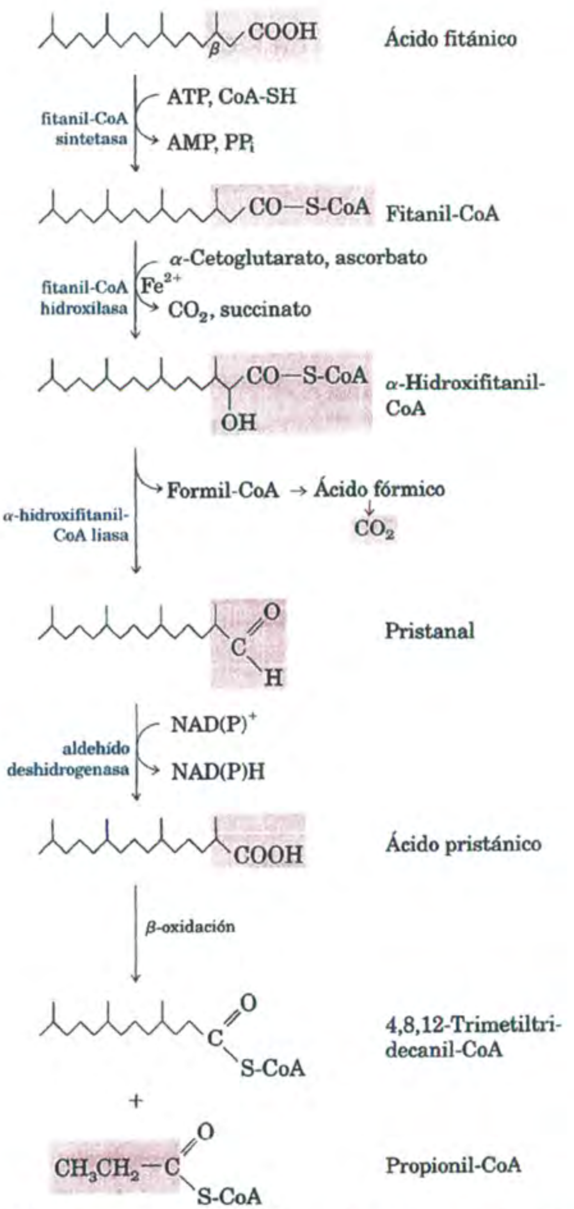


FIGURA 17–17 **α-Oxidación de un ácido graso de cadena ramificada (ácido fitánico) en peroxisomas.** El ácido fitánico tiene un carbono β sustituido con un metilo, por lo que no puede experimentar β-oxidación. La acción combinada de los enzimas que se muestran aquí eliminan el carbono carboxílico del ácido fitánico, lo que da ácido pristánico, en el que el carbono β no está sustituido, lo que permite la β-oxidación. Observe que la β-oxidación del ácido pristánico libera propionil-CoA y no acetil-CoA. El propionil-CoA prosigue su catabolismo tal como se muestra en la Figura 17–11. (Los detalles de la reacción que produce pristanal son objeto de controversia.)

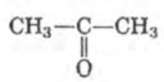
interviene el oxígeno molecular, se descarboxila formando un aldehído con un carbono menos y a continuación se oxida al correspondiente ácido carboxílico que ahora no tiene sustituyente en el carbono β y que puede continuar su oxidación a través de la β-oxidación. La **enfermedad de Refsum,** resultado de un defecto genético en la fitanil-CoA hidroxilasa, se caracteriza por concentraciones muy elevadas de ácido fitánico en la sangre y por problemas neurológicos graves, entre ellos ceguera y sordera. ■

RESUMEN 17.2 Oxidación de los ácidos grasos

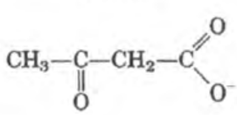
- En la primera fase de la β-oxidación, cuatro reacciones eliminan cada una de las unidades de acetil-CoA del extremo carboxilo de un acil graso–CoA saturado: (1) deshidrogenación de los carbonos α y β (C-2 y C-3) por acil-CoA deshidrogenasas unidas a FAD, (2) hidratación del doble enlace *trans*-Δ^2 resultante por la enoil-CoA hidratasa, (3) deshidrogenación del L-β-hidroxiacil-CoA resultante por parte de la β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa unida a NAD y (4) rotura por parte de la tiolasa y en presencia de CoA del β-cetoacil-CoA resultante, para formar acetil-CoA y un acil graso–CoA acortado en dos carbonos. El acil graso–CoA acortado entra entonces de nuevo en la secuencia.
- En la segunda fase de la oxidación de ácidos grasos el acetil-CoA se oxida a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico. Una parte importante del rendimiento teórico de energía libre de la oxidación de ácidos grasos se recupera en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa en la fase final de la ruta oxidativa.
- El malonil-CoA, un intermediario temprano de la síntesis de ácidos grasos, inhibe la carnitina aciltransferasa I, impidiendo la entrada de ácidos grasos en la mitocondria. Esto bloquea la degradación de ácidos grasos cuando se produce la síntesis de los mismos.
- Defectos genéticos en la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media tienen como resultado la aparición de una grave enfermedad en humanos. Lo mismo ocurre con mutaciones en otros componentes del sistema de la β-oxidación.
- La oxidación de ácidos grasos insaturados requiere dos enzimas adicionales: la enoil-CoA isomerasa y la 2,4-dienoil-CoA reductasa. Los ácidos grasos de número impar de carbonos se oxidan mediante la ruta de la β-oxidación, dando acetil-CoA y una molécula de propionil-CoA. Éste se carboxila a metilmalonil-CoA, que se isomeriza a succinil-CoA en una reacción catalizada por la metilmalonil-CoA mutasa, un enzima que requiere coenzima B_{12}.
- Los peroxisomas de plantas y animales y los glioxisomas de las plantas llevan a cabo la β-oxidación en cuatro pasos similares a los de la ruta mitocondrial en los animales. El primer paso de oxidación, sin embargo, transfiere los electrones directamente al O_2, generando H_2O_2. Los peroxisomas de los tejidos animales están especializados en la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga y ácidos grasos ramificados. En los glioxisomas, de las semillas en germinación, la β-oxidación sirve para convertir lípidos almacenados en diversos intermediarios y productos.
- La reacciones de la ω-oxidación, que tienen lugar en el retículo endoplasmático, producen intermediarios acil graso dicarboxílicos que pueden experimentar β-oxidación en cualquier extremo, dando ácidos dicarboxílicos cortos tales como el succinato.

17.3 Cuerpos cetónicos

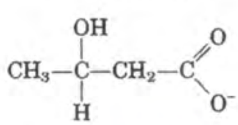
En los humanos y en la mayoría de los mamíferos, el acetil-CoA formado en el hígado durante la oxidación de los ácidos grasos puede entrar en el ciclo del ácido cítrico (fase 2 de la Fig. 17–7) o puede ser convertido en los "cuerpos cetónicos" **acetona, acetoacetato** y **D-β-hidroxibutirato,** para ser exportados a otros tejidos. (El término "cuerpos" proviene de un malentendido histórico; el término se aplica ocasionalmente a partículas insolubles, pero estos compuestos son muy solubles en la sangre y en la orina.) La acetona, producida en menores cantidades que los demás cuerpos cetónicos, se exhala. El acetoacetato y el D-β-hidroxibutirato son transportados por la sangre a tejidos diferentes al hígado (tejidos extrahepáticos), donde se convierten en acetil-CoA y se oxidan a través del ciclo del ácido cítrico, proporcionando gran parte de la energía necesaria para tejidos tales como los músculos esquelético y cardíaco y la corteza suprarrenal. El cerebro, que usa preferentemente glucosa como combustible, puede adaptarse al uso de acetoacetato o D-β-hidroxibutirato en condiciones de inanición, cuando no es posible disponer de glucosa. La producción y exportación de cuerpos cetónicos desde el hígado a los tejidos extrahepáticos permite la oxidación continuada de ácidos grasos en el hígado cuando el acetil-CoA no está siendo oxidado en el ciclo del ácido cítrico.



Acetona



Acetoacetato



D-β-Hidroxibutirato

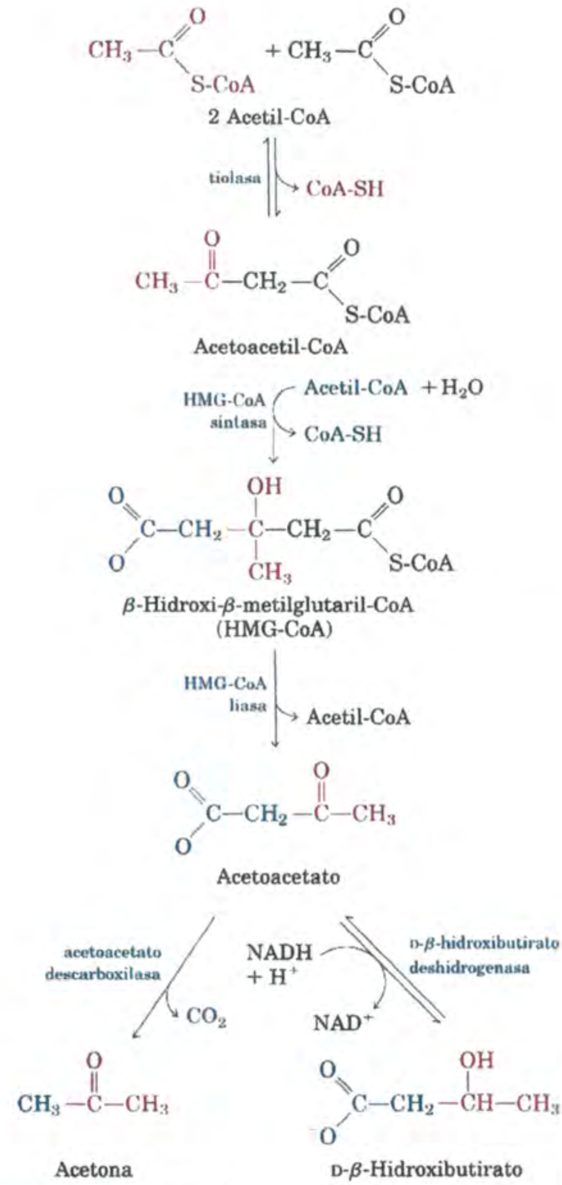


FIGURA 17–18 Formación de cuerpos cetónicos a partir de acetil-CoA. Los individuos sanos y bien alimentados producen cuerpos cetónicos a una velocidad relativamente baja. Cuando se produce una acumulación de acetil-CoA (como en la inanición o la diabetes sin tratar, por ejemplo), la tiolasa cataliza la condensación de dos moléculas de acetil-CoA a acetoacetil-CoA, el compuesto precursor de los tres cuerpos cetónicos. Las reacciones de formación de cuerpos cetónicos se producen en la matriz de las mitocondrias del hígado. El compuesto de seis átomos de carbono β-hidroxi-β-metilglutaril–CoA (HMG-CoA) es también un intermediario de la biosíntesis de esteroles, pero el enzima que forma HMG-CoA en esa ruta es citosólico. La HMG-CoA liasa sólo está presente en la matriz mitocondrial.

Los cuerpos cetónicos formados en el hígado se exportan a otros órganos como combustible

El primer paso de la formación de acetoacetato en el hígado **(Fig. 17–18)** es la condensación enzimática de dos moléculas de acetil-CoA, catalizada por la tiolasa; esta reacción es simplemente la inversa del último paso de la β-oxidación. A continuación, el acetoacetil-CoA se condensa con acetil-CoA para formar el **β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA),** que se rompe formando acetoacetato libre y acetil-CoA. El acetoacetato es reducido reversiblemente a D-β-hidroxibutirato por acción del enzima mitocondrial D-β-hidroxibutirato deshidrogenasa. Este enzima es específico para el estereoisómero D; no puede actuar sobre los L-β-hidroxiacil-CoA y no debe confundirse con la L-β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de la ruta de la β-oxidación.

En las personas sanas, la acetona se forma en muy pequeñas cantidades a partir del acetoacetato, que es fácilmente descarboxilado ya sea espontáneamente o por acción de la **acetoacetato descarboxilasa** (Fig. 17–18). Los diabéticos no sometidos a tratamiento producen grandes cantidades de acetoacetato y por ello su sangre contiene cantidades significativas de acetona, que es tóxica. La acetona es volátil y confiere un olor característico al aliento, que a veces es de utilidad en el diagnóstico de la diabetes. ■

En los tejidos extrahepáticos, el D-β-hidroxibutirato se oxida a acetoacetato por acción de la D-β-hidroxibutirato deshidrogenasa **(Fig. 17–19)**. El acetoacetato se activa formando su éster de coenzima A por transferencia del CoA del succinil-

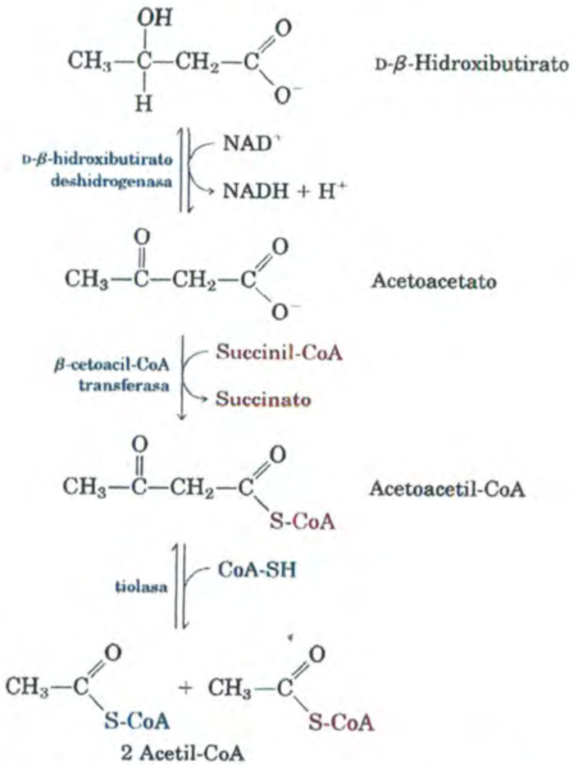


FIGURA 17–19 El D-β-hidroxibutirato como combustible. El D-β-hidroxibutirato sintetizado en el hígado pasa a la sangre y a través de ella a otros tejidos, donde se convierte en tres pasos en acetil-CoA. En primer lugar se oxida a acetoacetato, que es activado por el coenzima A donado por el succinil-CoA; a continuación, es escindido por la tiolasa. El acetil-CoA así formado se utiliza para la producción de energía.

CoA, un intermediario del ciclo del ácido cítrico (véase la Fig. 16–7), en una reacción catalizada por la **β-cetoacil-CoA transferasa,** también llamada tioforasa. A continuación, y por acción de la tiolasa, el acetoacetil-CoA se rompe en dos moléculas de acetil-CoA que entran en el ciclo del ácido cítrico. De este modo los cuerpos cetónicos se utilizan como combustible en todos los tejidos excepto el hígado, que carece de tioforasa. El hígado es, por tanto, un productor de cuerpos cetónicos para los demás tejidos, pero no es consumidor de los mismos.

La producción y exportación de cuerpos cetónicos por el hígado permite la oxidación continuada de ácidos grasos con sólo una oxidación mínima del acetil-CoA. Cuando se extraen intermediarios del ciclo del ácido cítrico para la síntesis de glucosa por la gluconeogénesis, la oxidación de intermediarios del ciclo se hace más lenta, lo mismo que la oxidación del acetil-CoA. Además, el hígado sólo contiene una cantidad limitada de coenzima A y cuando la mayor parte se halla ligado en forma de acetil-CoA la β-oxidación se ralentiza por falta de coenzima libre. La producción y exportación de cuerpos cetónicos libera coenzima A, lo que permite la oxidación continuada de ácidos grasos.

Durante la diabetes y en situaciones de inanición se da una sobreproducción de cuerpos cetónicos

La inanición y la diabetes mellitus no tratada conducen a una sobreproducción de cuerpos cetónicos que lleva asociados diversos problemas médicos. Durante la inanición, la gluconeogénesis consume los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, desviando el acetil-CoA a la producción de cuerpos cetónicos **(Fig. 17–20)**. En la diabetes sin tratar, cuando el nivel de insulina es insuficiente, los tejidos extrahepáticos no pueden captar glucosa de la sangre de manera eficiente para utilizarla como combustible o para convertirla en grasas. En estas condiciones, disminuye la concentración de malonil-CoA (el producto de partida para la síntesis de ácidos grasos), desaparece la inhibición de la carnitina aciltransferasa I y los ácidos grasos entran en la mitocondria para ser degradados a acetil-CoA, el cual no puede pasar a través del ciclo del ácido cítrico ya que los intermediarios del ciclo han sido eliminados para su uso como sustratos en la gluconeogénesis. La acumulación resultante de acetil-CoA acelera la formación de cuerpos cetónicos hasta superar la capacidad de los tejidos extrahepáticos para oxidarlos. El aumento en los niveles sanguíneos de acetoacetato y de D-β-hidroxibutirato hace descender el pH sanguíneo, causando **acidosis.** Una acidosis extrema puede conducir al coma y en algunos casos a la muerte. Los cuerpos cetónicos en la sangre y orina de diabéticos sin tratar pueden llegar a alcanzar niveles extraordinarios: una concentración sanguínea de 90 mg/100 mL (en comparación con el valor normal de $<$3 mg/100mL) y una excreción urinaria de 5.000 mg/24 h (en comparación con una velocidad normal de $\leq$125 mg/24 h). Este estado se conoce como **cetosis.**

Los individuos sujetos a dietas muy bajas en calorías, que utilizan las grasas del tejido adiposo como fuente principal de energía, también tienen unos niveles de cuerpos cetónicos en sangre y orina superiores. Estas concentraciones deben controlarse para evitar la acidosis y la cetosis (cetoacidosis). ■

IMPORTANTE

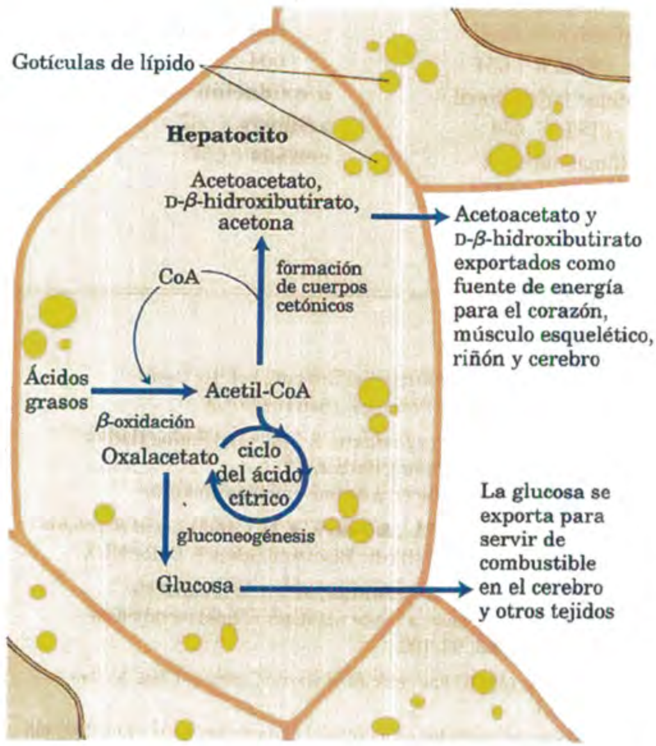


FIGURA 17–20 Formación de cuerpos cetónicos y exportación desde el hígado. En situaciones con un incremento de la gluconeogénesis (diabetes no tratada, dieta muy estricta, ayuno), el ciclo del ácido cítrico se ralentiza (por drenaje del oxalacetato) y aumenta el ritmo de conversión del acetil-CoA en acetoacetato. El coenzima A liberado permite la β-oxidación continua de ácidos grasos.

RESUMEN 17.3 Cuerpos cetónicos

- Los cuerpos cetónicos —acetona, acetoacetato y D-β-hidroxibutirato— se forman en el hígado. Los dos últimos compuestos sirven como moléculas de combustible en tejidos extrahepáticos a través de la oxidación a acetil-CoA y entrada en el ciclo del ácido cítrico.
- La sobreproducción de cuerpos cetónicos en la diabetes incontrolada o en la reducción drástica de calorías puede provocar acidosis o cetosis.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

Bibliografía

General

Boyer, P.D. (1983) *The Enzymes*, 3rd edn, Vol. 16: *Lipid Enzymology*, Academic Press, Inc., San Diego, CA.

Ferry, G. (1998) *Dorothy Hodgkin: A Life*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
Biografía fascinante acerca de una mujer asombrosa.

Gurr, M.I., Harwood, J.L., & Frayn, K.N. (2002) *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 5th edn, Blackwell Science, Oxford, UK.

Langin, D., Holm, C., & Lafontan, M. (1996) Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 93–109.

Ramsay, T.G. (1996) Fat cells. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **25**, 847–870.
Revisión de todos los aspectos del almacenamiento y movilización de grasas en los adipocitos.

Scheffler, I.E. (1999) *Mitochondria*, Wiley-Liss, New York.
Libro excelente sobre la estructura y función de la mitocondria.

Wang, C.S., Hartsuck, J., & McConathy, W.J. (1992) Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 1–17.
Discusión avanzada acerca del enzima que libera ácidos grasos de lipoproteínas en los capilares del músculo y del tejido adiposo.

Wood, P.A. (2006) *How Fat Works*, Harvard University Press, Cambridge, MA.
Descripción de nivel intermedio y fácil lectura sobre la contribución de la genética y los modelos de ratones al conocimiento del metabolismo de los lípidos y la obesidad.

β-Oxidación mitocondrial

Bannerjee, R. (1997) The yin-yang of cobalamin biochemistry. *Chem. Biol.* **4**, 175–186.
Una revisión de la bioquímica de las reacciones del coenzima B_{12}, incluyendo la reacción de la metilmalonil-CoA mutasa.

Carey, H.V., Andrews, M.T., & Martin, S.L. (2003) Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol. Rev.* **83**, 1153–1181.

Desverne, B., Michalik, L., & Wahij, W. (2006) Transcriptional regulation of metabolism *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.
Revisión extensa de la regulación del metabolismo, incluido el metabolismo de las grasas, por los factores de transcripción.

Eaton, S., Bartlett, K., & Pourfarzam, M. (1996) Mammalian mitochondrial β-oxidation. *Biochem. J.* **320**, 345–357.
Revisión de la enzimología de la β-oxidación, los defectos hereditarios en esta ruta, y la regulación del proceso en las mitocondrias.

Eaton, S., Bursby, T., Middleton, B., Pourfarzam, M., Mills, K., Johnson, A.W., & Bartlett, K. (2000) The mitochondrial trifunctional protein: centre of a β-oxidation metabolon? *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 177–182.
Revisión corta a nivel intermedio.

Evans, R.M., Barish, G.D., & Wang, Y.-X. (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* **10**, 1–7.
Descripción de nivel intermedio y fácil lectura del descubrimiento de los PPAR y sus funciones.

Harwood, J.L. (1988) Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 101–138.

Jeukendrup, A.E., Saris, W.H., & Wagenmakers, A.J. (1998) Fat metabolism during exercise: a review. Part III: effects of nutritional interventions. *Int. J. Sports Med.* **19**, 371–379.
Este es un artículo de una serie que revisa los diversos factores que influyen en la movilización de las grasas y su utilización durante el ejercicio.

Kampf, J.P. & Kleinfeld, A.M. (2007) Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? *Physiology* **22**, 7–14.

Kerner, J. & Hoppel, C. (1998) Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 179–206.

Kerner, J. & Hoppel, C. (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 1–17.

Kunau, W.H., Dommes, V., & Schulz, H. (1995) β-Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipid Res.* **34**, 267–342.
Buena descripción histórica y una comparación útil de la β-oxidación en diferentes sistemas.

Mandard, S., Muller, M., & Kersten, S. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 393–416.
Revisión de los genes controlados por PPARα.

Rinaldo, P., Matern, D., & Bennett, M.J. (2002) Fatty acid oxidation disorders. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 477–502.
Revisión avanzada de los defectos metabólicos en la oxidación de las grasas, incluyendo las mutaciones en la MCAD.

Rufer, A.C., Thoma, R., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., De Roo, E., Banner, D.W., Mueller, F., Chomienne, O., & Hennig, M. (2006) The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment. *Structure* **14**, 713–723.

Sherratt, H.S. (1994) Introduction: the regulation of fatty acid oxidation in cells. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 421–422.

Introducción a las revisiones (en este número de la revista) sobre varios aspectos de la oxidación de los ácidos grasos y su regulación.

Thorpe, C. & Kim, J.J. (1995) Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J.* **9**, 718–725.

Descripción breve y clara de la estructura tridimensional y el mecanismo catalítico de estos enzimas.

β-Oxidación peroxisómica

Graham, I.A. & Eastmond, P.J. (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog. Lipid Res.* **41**, 156–181.

Wanders, R.J.A., van Grunsven, E.G., & Jansen, G.A. (2000) Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid α- and β-oxidation systems in humans. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 141–148.

Cuerpos cetónicos

Foster, D.W. & McGarry, J.D. (1983) The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *N. Engl. J. Med.* **309**, 159–169.

McGarry, J.D. & Foster, D.W. (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 395–420.

Robinson, A.M. & Williamson, D.H. (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* **60**, 143–187.

Problemas

1. Energía de los triacilgliceroles Tomando como referencia la cantidad por carbono: ¿dónde reside la mayor cantidad de energía metabólica disponible en los triacilgliceroles: en la parte ácido graso o en la parte glicerol? Indique de qué manera el conocimiento de la estructura química de los triacilgliceroles proporciona la respuesta.

2. Reservas de combustible en el tejido adiposo Los triacilgliceroles, con sus ácidos grasos de tipo hidrocarburo, poseen el mayor contenido en energía entre los principales nutrientes.

(a) Si el 15% de la masa corporal de un adulto de 70,0 kg de peso consiste en triacilgliceroles, calcule su reserva total de combustible disponible en kilojoules y en kilocalorías. Recuerde que 1,00 kcal = 4,18 kJ.

(b) Si las necesidades basales de energía son de aproximadamente 8.400 kJ/día (2.000 kcal/día), ¿durante cuánto tiempo podría sobrevivir esta persona si la oxidación de los ácidos grasos almacenados como triacilgliceroles fuera su única fuente de energía?

(c) ¿Cuál sería la pérdida de peso en libras por día en tales condiciones de inanición (1 lb = 0,454 kg)?

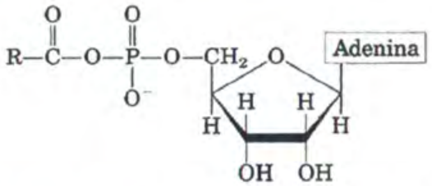
3. Reacciones comunes del ciclo de la oxidación de ácidos grasos y del ciclo del ácido cítrico Las células utilizan a menudo el mismo tipo de reacciones para llevar a cabo conversiones metabólicas análogas. Así, los pasos de la oxidación del piruvato a acetil-CoA y del α-cetoglutarato a succinil-CoA son muy parecidos a pesar de ser catalizados por enzimas diferentes. La primera fase de la oxidación de los ácidos grasos sigue una secuencia de reacciones que recuerda en gran medida otra que se da en el ciclo del ácido cítrico. Muestre, mediante ecuaciones, las secuencias de reacción análogas en ambas rutas.

4. β-Oxidación: ¿Cuántos ciclos? ¿Cuántos ciclos de β-oxidación se requieren para la oxidación completa del ácido oleico, $18{:}1(\Delta^9)$ activado?

5. Química de la reacción de la acil-CoA sintetasa Los ácidos grasos se convierten en sus ésteres de coenzima A mediante una reacción reversible catalizada por la acil-CoA sintetasa:

$$\text{R—COO}^- + \text{ATP} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{R—}\overset{\text{O}}{\overset{\|}{\text{C}}}\text{—CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

(a) Se ha identificado el intermedio unido al enzima en esta reacción como el anhídrido mixto entre el ácido graso y el adenosina monofosfato (AMP), acil-AMP:



Escriba dos ecuaciones que correspondan a los dos pasos de la reacción catalizada por la acil-CoA sintetasa.

(b) La reacción de la acil-CCoA sintetasa descrita es fácilmente reversible, con una constante de equilibrio cercana a 1. ¿Cómo puede favorecerse la formación del acil graso–CoA en esta reacción?

6. Intermediarios en la oxidación del ácido oleico ¿Qué estructura tiene el grupo acilo graso parcialmente oxidado que se forma cuando el ácido oleico, $18{:}1(\Delta^9)$ ha experimentado tres ciclos de β-oxidación? ¿Cuáles son los dos pasos siguientes en la oxidación continuada de este intermediario?

7. β-Oxidación de un ácido graso de cadena impar ¿Cuáles son los productos directos de la β-oxidación de un ácido graso de 11 carbonos totalmente saturado y de cadena lineal?

8. Oxidación del palmitato tritiado Se añade palmitato marcado uniformemente con tritio (^{3}H), con una actividad específica de $2{,}48 \times 10^8$ cuentas por minuto (cpm) por micromol de palmitato, a una preparación mitocondrial que lo oxida a acetil-CoA. Se aísla el acetil-CoA y se hidroliza a acetato. La actividad específica del acetato aislado es de $1{,}00 \times 10^7$ cpm/μmol. ¿Es este resultado coherente con la ruta de la β-oxidación? Explíquelo. ¿Cuál es el destino final del tritio eliminado?

9. Compartimentación de la β-oxidación El palmitato libre se activa a su forma de derivado del coenzima A (palmitil-CoA) en el citosol, antes de poder ser oxidado en la mitocondria. Si se añade palmitato y [^{14}C] coenzima A a un homogenado de hígado, el palmitil-CoA aislado de la fracción citosólica es radiactivo, pero el aislado de la fracción mitocondrial no. ¿Por qué?

10. Bioquímica comparativa: Rutas de generación de energía en las aves Una indicación de la importancia relativa de las diversas rutas productoras de ATP es la V_{max} de ciertos enzimas de estas rutas. A continuación se muestra la V_{max} de varios enzimas de los músculos pectorales (músculos del pecho utilizados para el vuelo) de la paloma y del faisán.

	V_{max} (μmol sustrato/min/g tejido)	
Enzima	**Paloma**	**Faisán**
Hexoquinasa	3,0	2,3
Glucógeno fosforilasa	18,0	120,0
Fosfofructoquinasa-1	24,0	143,0
Citrato sintasa	100,0	15,0
Triacilglicerol lipasa	0,07	0,01

(a) Discuta la importancia relativa del metabolismo del glucógeno y el metabolismo de las grasas en la generación de ATP en los músculos pectorales de estas aves.

(b) Compare el consumo de oxígeno de las dos aves.

(c) A juzgar por los datos de la tabla, ¿qué ave es la que vuela grandes distancias? Justifique su respuesta.

(d) ¿Por qué se seleccionaron estos enzimas en particular para la comparación? ¿Serían las actividades de la triosa fosfato isomerasa y la malato deshidrogenasa bases igualmente buenas para la comparación? Explíquelo.

11. Carnitina aciltransferasa mutante ¿Qué cambios en el patrón del metabolismo se producirían como consecuencia de una mutación en la carnitina aciltransferasa I de músculo en la que la proteína mutante hubiese perdido su afinidad hacia el malonil-CoA pero no su actividad catalítica?

12. Efecto de la deficiencia de carnitina Un paciente desarrolló una enfermedad caracterizada por una progresiva debilidad muscular y por dolorosos calambres musculares. Los síntomas se agravaron con el ayuno, el ejercicio y una dieta rica en grasas. El homogenado de una muestra de músculo esquelético del paciente oxidaba el oleato añadido más lentamente que lo que lo hacían homogenados control de muestras de músculo de individuos sanos. Cuando se añadió carnitina al homogenado de músculo del paciente, la velocidad de oxidación de oleato medida igualó a la de los homogenados control. Al paciente se le diagnosticó una deficiencia de carnitina.

(a) ¿Por qué la adición de carnitina incrementaba la velocidad de oxidación del oleato en el homogenado de músculo?

(b) ¿Por qué se agravaban los síntomas del paciente por el ayuno, el ejercicio y la dieta rica en grasas?

(c) Sugiera dos posibles razones que expliquen la deficiencia de carnitina en el músculo en este paciente.

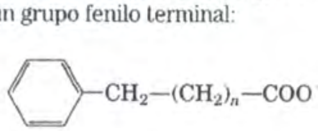
13. Los ácidos grasos como fuente de agua En contra de lo que se cree, los camellos no almacenan agua en sus jorobas, que de hecho son grandes depósitos de grasa. ¿Cómo pueden utilizarse estos depósitos como fuente de agua? Calcule la cantidad de agua (en litros) que puede ser producida por un camello a partir de 1,0 kg de grasa. Considere, para simplificar el problema, que la grasa consiste únicamente en tripalmitilglicerol.

14. El petróleo como fuente de nutrientes microbianos Algunos microorganismos de los géneros *Nocardia* y *Pseudomonas* pueden crecer en ambientes en los que los hidrocarburos son la única fuente nutritiva. Estas bacterias oxidan los hidrocarburos alifáticos de cadena lineal, como por ejemplo el octano, a sus correspondientes ácidos carboxílicos:

$$CH_3(CH_2)_6CH_3 + NAD^+ + O_2 \rightleftharpoons CH_3(CH_2)_6COOH + NADH + H^+$$

¿Cómo se podrían utilizar estas bacterias para eliminar mareas negras? Indique algunos de los factores limitantes de la eficiencia de este proceso.

15. Metabolismo de un ácido graso fenilado de cadena lineal Se aisló un metabolito cristalino de la orina de un conejo al que se le había suministrado un ácido graso de cadena lineal que contenía un grupo fenilo terminal:



Una muestra de 302 mg del metabolito en solución acuosa se neutralizó completamente por adición de 22,2 mL de NaOH 0,100 M.

(a) Indique la masa molecular y la estructura probables del metabolito.

(b) La cadena lineal de ácido graso ¿contenía un número par o impar de grupos metileno (—CH_2—) (es decir, es n par o impar)? Explique la respuesta.

16. Oxidación de ácidos grasos en diabéticos no controlados Cuando el acetil-CoA producido durante la β-oxidación en el hígado excede la capacidad del ciclo del ácido cítrico, el exceso de acetil-CoA forma los cuerpos cetónicos acetona, acetoacetato y D-β-hidroxibutirato. Esta situación se da en casos de diabetes grave no controlada: como los tejidos no pueden utilizar glucosa, oxidan en cambio grandes cantidades de ácidos grasos. A pesar de que el acetil-CoA no es tóxico, la mitocondria debe desviar el acetil-CoA hacia los cuerpos cetónicos. ¿Qué problema surgiría si el acetil-CoA no se convirtiera en cuerpos cetónicos? ¿De qué manera se soluciona el problema gracias a esta desviación?

17. Consecuencias de una dieta rica en grasas y sin glúcidos Suponga que tuviera que subsistir con una dieta consistente en grasa de ballena y de foca, sin prácticamente ningún aporte de glúcidos.

(a) ¿Cuál sería el efecto de la privación de glúcidos sobre la utilización de grasas para la obtención de energía?

(b) Si la dieta no contuviera glúcidos en absoluto, ¿sería mejor consumir ácidos grasos de cadena par o impar? Explíquelo.

18. Ácidos grasos de cadena par e impar en la dieta En un experimento de laboratorio, se alimentaron dos grupos de ratas con dos ácidos grasos diferentes como única fuente de carbono durante un mes. Al primer grupo se le dio ácido heptanoico (7:0) y al segundo ácido octanoico (8:0). Después del experimento, se observó una diferencia notable entre los dos grupos. Los del primer grupo estaban sanos y habían ganado peso, mientras que los del segundo grupo estaban débiles y habían perdido peso como resultado de pérdida de masa muscular. ¿Cuál es la base bioquímica de esta diferencia?

19. Consecuencias metabólicas de la ingestión de ω-fluorooleato El arbusto *Dichapetalum toxicarium*, que crece en Sierra Leona, produce ω-fluorooleato, que es muy tóxico para los animales de sangre caliente.

$$F{-}CH_2{-}(CH_2)_7{-}\overset{H}{\overset{|}{C}}{=}\overset{H}{\overset{|}{C}}{-}(CH_2)_7{-}COO^-$$

ω-Fluorooleato

Esta sustancia se ha utilizado como veneno para flechas, y el fruto pulverizado se utiliza a veces como raticida (de ahí el nombre común de la planta, raticida) ¿Por qué es tan tóxica esta sustancia? (Pista: Revise el Capítulo 16, Problema 22.)

20. Acetil-CoA carboxilasa mutante ¿Qué consecuencias tendría para el metabolismo de las grasas una mutación en la acetil-CoA carboxilasa que reemplazase el residuo *Ser fosforilado* normalmente por la AMPK por un residuo Ala? ¿Qué pasaría si el mismo residuo Ser fuese reemplazado por Asp? (Pista: Véase la Fig. 17–12.)

21. Efecto de un inhibidor de la PDE sobre los adipocitos ¿Cómo se vería afectada la respuesta de los adipocitos a la adrenalina al añadir un inhibidor de la cAMP fosfodiesterasa (PDE)? (Pista: Véase la Fig. 12–4.)

22. Papel del FAD como aceptor de electrones La acil-CoA deshidrogenasa utiliza FAD unido al enzima como grupo prostético para la deshidrogenación de los carbonos α y β del acil graso–CoA. ¿Cuál es la ventaja de utilizar FAD como aceptor de electrones en lugar del NAD^+? Explíquelo en términos del potencial de reducción estándar para las semirreac-

ciones Enz-FAD/$FADH_2$ (E'° = −0,219 V) y NAD^+/NADH (E'° = −0,320 V).

23. β-Oxidación del ácido araquídico ¿Cuántas vueltas del ciclo de oxidación de ácidos grasos se necesitan para oxidar el ácido araquídico (véase la Tabla 10–1) a acetil-CoA?

24. Destino del propionato marcado Si se añade [3-^{14}C] propionato (con ^{14}C en el grupo metilo) a un homogenado de hígado, rápidamente se produce oxalacetato marcado con ^{14}C. Dibuje la ruta por la que el propionato se transforma en oxalacetato e indique la localización del ^{14}C en el oxalacetato.

25. Metabolismo del ácido fitánico Cuando se alimenta un ratón con ácido fitánico marcado de manera uniforme con ^{14}C, se puede detectar actividad en el malato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, al cabo de pocos minutos. Diseñe una ruta metabólica que podría explicar esta observación. ¿Qué átomo de carbono del malato contendría la marca de ^{14}C?

26. Origen de las moléculas de H_2O producidas durante la β-oxidación La oxidación completa del palmitil-CoA a dióxido de carbono y agua se representa por la ecuación global

$$\text{Palmitil-CoA} + 23O_2 + 108P_i + 108ADP \longrightarrow \text{CoA} + 16CO_2 + 108ATP + 23H_2O$$

Se produce también agua en la reacción

$$ADP + P_i \longrightarrow ATP + H_2O$$

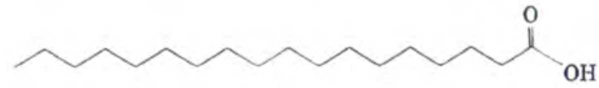
¿Por qué no se incluye esta agua como un producto neto de la reacción? ¿Por qué?

27. Importancia biológica del cobalto El ganado vacuno, los ciervos, las ovejas y otros animales rumiantes, producen grandes cantidades de propionato en el rumen a través de la fermentación bacteriana de la materia vegetal ingerida. El propionato es la fuente principal de glucosa para estos animales a través de la ruta propionato → oxalacetato → glucosa. En algunas regiones del mundo, como en Australia, los animales rumiantes muestran a veces síntomas de anemia con pérdidas concomitantes de apetito y retrasos en el crecimiento, como resultado de la incapacidad del animal para transformar propionato a oxalacetato. Este estado es debido a una deficiencia de cobalto que tiene su origen en los bajos niveles de cobalto existentes en el suelo, y por lo tanto en la materia vegetal. Explíquelo.

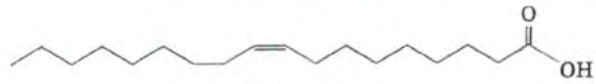
28. Pérdida de grasa durante la hibernación Los osos gastan alrededor de 25 × 10^6 J/día durante los períodos de hibernación, que pueden durar hasta siete meses. La energía que necesitan para mantener la vida se obtiene de la oxidación de ácidos grasos. ¿Qué pérdida de peso (medida en kilogramos) ha tenido lugar tras siete meses? ¿Cómo puede minimizarse la cetosis durante la hibernación? (Suponga que la oxidación de grasa da lugar a 38 kJ/g.)

Problema de análisis de datos

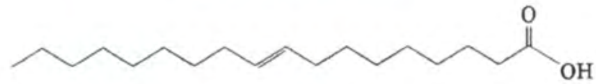
29. β-Oxidación de grasas *trans* Las grasas insaturadas con dobles enlaces trans se conocen habitualmente como "grasas *trans*". Ha habido un gran debate sobre los efectos de las grasas *trans* de la dieta sobre la salud. En sus investigaciones sobre los efectos del metabolismo de los ácidos grasos trans sobre la salud, Yu y colaboradores (2004) demostraron que un ácido graso *trans* modelo se trataba de manera diferente que su isómero *cis*. Utilizaron tres ácidos grasos relacionados de 18 átomos de carbono para explorar la diferencia en la β-oxidación entre los isómeros *cis* y *trans* del ácido graso de igual tamaño.



Ácido esteárico
(ácido octadecenoico)

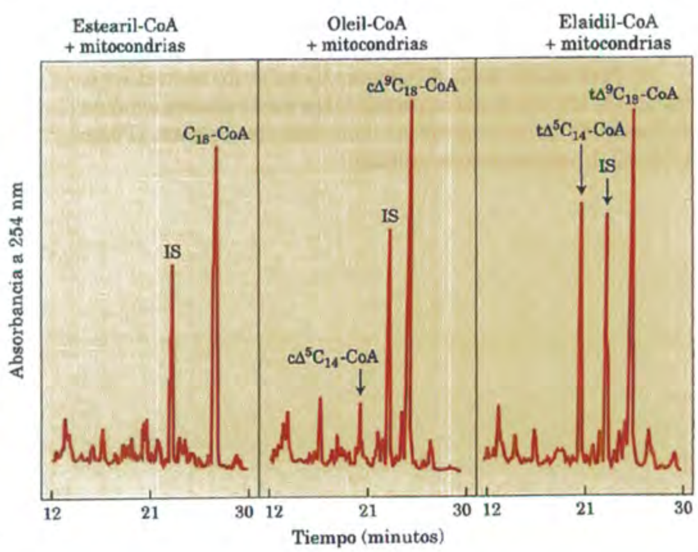


Ácido oleico
(ácido *cis*-Δ⁹-octadecenoico)

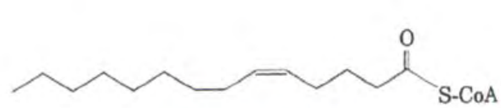


Ácido elaídico
(ácido *trans*-Δ⁹-octadecenoico)

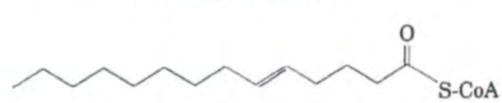
Incubaron el derivado de cada ácido con el coenzima A con mitocondrias de hígado de rata durante 5 minutos y a continuación separaron los derivados de CoA que aún permanecían en cada mezcla mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). A continuación se muestran los resultados con paneles separados para cada experimento.



En la figura IS indica un estándar interno (pentadecanil-CoA) añadido a la mezcla, después de la reacción, como marcador molecular. Los investigadores dieron las siguientes abreviaturas a los derivados del CoA: estearil-CoA, C_{18}-CoA; *cis*-Δ^5-tetradecenil-CoA, cΔ^5C_{14}-CoA; oleil-CoA, cΔ^9C_{18}-CoA; *trans*-Δ^5-tetradecenil-CoA; tΔ^5C_{14}-CoA y elaidil-CoA, tΔ^9C_{18}-CoA.



***cis*-Δ⁵-Tetradecenil-CoA**



***trans*-Δ⁵-Tetradecenil-CoA**

(a) ¿Por qué Yu y colaboradores tuvieron que utilizar derivados del CoA y no los ácidos grasos libres en estos experimentos?

(b) ¿Por qué no se encontraron derivados del CoA de menor masa molecular en la reacción con estearil-CoA?

(c) ¿Cuántas vueltas de β-oxidación serían necesarias para convertir el oleil-CoA y el elidil-CoA en *cis*-Δ^5-tetradecenil-CoA y *trans*-Δ^5-tetradecenil-CoA, respectivamente?

Existen dos formas del enzima acil-CoA deshidrogenasa (véase la Fig. 17–8a): acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD) y acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD). Yu y colaboradores midieron los parámetros cinéticos de ambos enzimas. Utilizaron los derivados de CoA de los tres ácidos grasos: tetradecanil-CoA (C_{14}-CoA), *cis*-Δ^5-tetradecenil-CoA (cΔ^5C_{14}-CoA) y *trans*-Δ^5-tetradecenil-CoA (tΔ^5C_{14}-CoA). Los resultados se muestran a continuación. (Véase el Capítulo 6 para las definiciones de los parámetros cinéticos.)

	LCAD			VLCAD		
	C_{14}-CoA	cΔ^5C_{14}-CoA	tΔ^5C_{14}-CoA	C_{14}-CoA	cΔ^5C_{14}-CoA	tΔ^5C_{14}-CoA
V_{max}	3,3	3,0	2,9	1,4	0,32	0,88
K_m	0,41	0,40	1,6	0,57	0,44	0,97
k_{cat}	9,9	8,9	8,5	2,0	0,42	1,12
k_{cat}/K_m	24	22	5	4	1	1

(d) Para LCAD, la K_m difiere mucho entre los sustratos *cis* y *trans*. Dé una explicación plausible para esta observación en función de las estructuras de las moléculas de sustrato. (Pista: La Fig. 10–2 puede serle de utilidad.)

(e) Los parámetros cinéticos de los dos enzimas son pertinentes de cara a la modificación diferencial de estos ácidos grasos *sólo* si la reacción de la LCAD o de la VLCAD (o ambas) es el paso limitante de velocidad de la ruta. ¿Qué pruebas hay que apoyen esta suposición?

(f) ¿De qué modo estos paramétros cinéticos diferentes explican los diferentes niveles de los derivados de CoA encontrados después de la incuación de las mitocondrias de hígado de rata con estearil-CoA, oleil-CoA y elaidil-CoA (mostrados en la figura de tres paneles)?

Yu y colaboradores midieron la especificidad de sustrato de la tioesterasa de mitocondrias de hígado de rata, que hidroliza los acil-CoA a CoA y ácidos grasos libres (véase el Capítulo 21). Este enzima tenía aproximadamente una actividad doble con tioésteres de C_{14}-CoA que con tioésteres de C_{18}-CoA.

(g) Otras investigaciones han sugerido que los ácidos grasos libres pueden pasar a través de membranas. En sus experimentos, Yu y colaboradores encontraron ácido *trans*-Δ^5tetradecenoico fuera de la mitocondria (es decir, en el medio) que se había incubado con elaidil-CoA. Describa la ruta que llevó a esta localización extramitocondrial del ácido *trans*-Δ^5-tetradecenoico. Asegúrese de indicar en qué lugar de la célula tiene lugar las diferentes transformaciones, así como de los enzimas que catalizan estas transformaciones.

(h) Se dice a menudo en la prensa popular que "sus células no degradan las grasas *trans* y que, por tanto, se acumulan en su cuerpo". ¿En qué sentido es correcta esta afirmación y en qué sentido es una simplificación?

Referencia

Yu, W., Liang, X., Ensenauer, R., Vockley, J., Sweetman, L., & Schultz, H. (2004) Leaky β-oxidation of a *trans*-fatty acid. *J. Biol. Chem.* 279, 52,160–52,167.

> Escogí el estudio de la síntesis de urea en el hígado porque parecía ser un problema relativamente sencillo.
>
> —*Hans Krebs, artículo en* Perspectives in Biology and Medicine, *1970*

18

Oxidación de aminoácidos y producción de urea

Centraremos ahora nuestra atención en los aminoácidos, la última clase de biomoléculas que, a través de su degradación oxidativa, contribuyen de manera significativa a la generación de energía metabólica. La fracción de la energía metabólica generada a partir de los aminoácidos, ya sean procedentes de proteínas de la dieta o de proteínas de los tejidos, varía mucho según el tipo de organismo y de las condiciones metabólicas. Los carnívoros pueden obtener (inmediatamente después de una comida) hasta el 90% de sus necesidades de energía a partir de la oxidación de aminoácidos, mientras que los herbívoros sólo pueden cubrir una pequeña parte de sus necesidades energéticas a través de esta ruta. La mayoría de microorganismos pueden nutrirse de aminoácidos del entorno y utilizarlos como combustible si las condiciones metabólicas lo requieren. Las plantas, sin embargo, raramente oxidan aminoácidos, si es que lo llegan a hacer, para obtener energía; los glúcidos producidos a partir de CO_2 y H_2O en la fotosíntesis son utilizados como fuente casi exclusiva de energía. Las concentraciones de los aminoácidos en los tejidos vegetales están reguladas cuidadosamente con la finalidad exclusiva de cubrir las necesidades para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas necesarias para el crecimiento. En las plantas se produce catabolismo de aminoácidos, pero su finalidad es la producción de metabolitos para otras rutas biosintéticas.

En los animales, los aminoácidos experimentan degradación oxidativa en tres situaciones metabólicas diferentes.

1. Durante la síntesis y degradación normales de proteínas celulares (recambio proteico; Capítulo 27), algunos de los aminoácidos liberados durante la degradación de las proteínas se degradan oxidativamente si no se necesitan para la síntesis de nuevas proteínas.
2. Cuando una dieta es rica en proteínas y los aminoácidos ingeridos exceden las necesidades corporales para la síntesis de proteínas, el excedente se cataboliza; los aminoácidos no se pueden almacenar.
3. Durante la inanición o en la diabetes mellitus, en las que no hay glúcidos disponibles o éstos no son utilizados adecuadamente, se recurre a las proteínas celulares como combustible.

En todas estas circunstancias metabólicas, los aminoácidos pierden sus grupos amino para formar α-cetoácidos, los "esqueletos carbonados" de los aminoácidos. Los α-cetoácidos experimentan oxidación a CO_2 y H_2O y, a menudo y más importante, proporcionan unidades de tres y cuatro carbonos que pueden convertirse a través de la gluconeogénesis en glucosa, el combustible para el cerebro, el músculo esquelético y otros tejidos.

Las rutas del catabolismo de los aminoácidos son muy semejantes en la mayoría de organismos. Este capítulo se centra en las rutas de los vertebrados, puesto que éstas son las que se han investigado con mayor atención. Al igual que en el caso del catabolismo de los glúcidos y ácidos grasos, los procesos de la degradación de aminoácidos convergen en las rutas catabólicas centrales. Los esqueletos carbonados de la mayoría de los aminoácidos van a parar al ciclo del ácido cítrico. En algunos casos, las rutas de reacción de la degradación de los aminoácidos siguen un estrecho paralelismo con el catabolismo de los ácidos grasos (Capítulo 17).

Existe una característica importante que distingue la degradación de aminoácidos de los otros procesos catabólicos descritos hasta este momento: cada aminoácido contiene un grupo amino. Por tanto, las rutas de degradación de los aminoácidos incluyen un paso clave en el que se separa el grupo α-amino del esqueleto carbonado desviándolo hacia rutas de metabolismo del

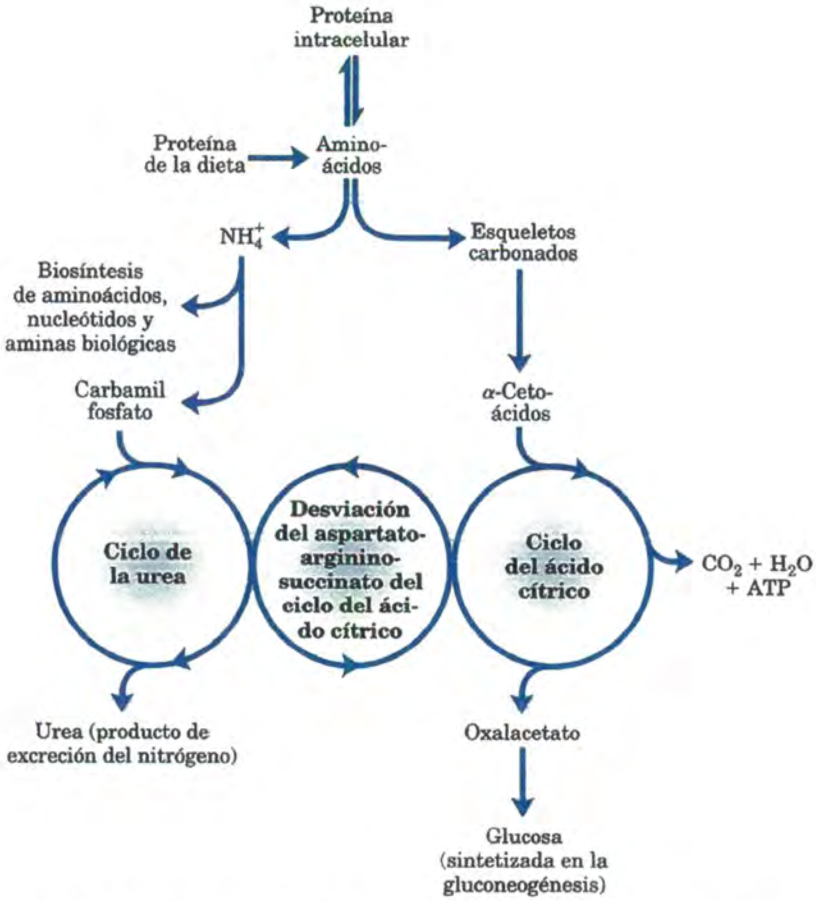


FIGURA 18–1 Visión general del catabolismo de los aminoácidos en los mamíferos. Los grupos amino y el esqueleto carbonado siguen rutas separadas pero interconectadas.

grupo amino **(Fig. 18-1)**. Trataremos en primer lugar el metabolismo del grupo amino y la excreción de nitrógeno, y a continuación seguiremos con el destino de los esqueletos carbonados obtenidos a partir de los aminoácidos; a lo largo de la explicación veremos cómo están interconectadas las rutas.

18.1 Destinos metabólicos de los grupos amino

El nitrógeno, N_2, es abundante en la atmósfera, pero es demasiado inerte para su utilización en la mayoría de procesos bioquímicos. Debido a que sólo unos pocos microorganismos pueden convertir N_2 en formas biológicamente útiles tales como el NH_3 (Capítulo 22), los grupos amino se utilizan de forma muy conservadora en los sistemas biológicos.

La **Figura 18–2a** presenta una visión general del catabolismo del amoníaco y de los grupos amino en los vertebrados. Los aminoácidos obtenidos a partir de las proteínas de la dieta son la fuente de la mayor parte de grupos amino. La mayoría de aminoácidos se metabolizan en el hígado. Parte del amoníaco generado en este proceso se recicla y se utiliza en diversas rutas biosintéticas; el exceso se excreta directamente o se convierte en urea o ácido úrico para su excreción, según el organismo (Fig. 18–2b). El exceso de amoníaco generado en otros tejidos (extrahepáticos) se transporta al hígado (en forma de grupos amino, tal como se describe más adelante) para su conversión en la forma de excreción.

El glutamato y la glutamina desempeñan papeles especialmente críticos en el metabolismo del nitrógeno actuando como una especie de punto de recogida de grupos amino. En el citosol de los hepatocitos, los grupos amino de la mayoría de los aminoácidos se transfieren al α-cetoglutarato formando glutamato. A continuación se transporta el glutamato a la mitocondria, donde cede el grupo amino para formar NH_4^+. El exceso de amoníaco generado en la mayor parte de los tejidos restantes se convierte en el nitrógeno amídico de la glutamina, que pasa al hígado y seguidamente a las mitocondrias del mismo. En la mayoría de tejidos, la glutamina o el glutamato, o ambos, se encuentran en concentraciones más elevadas que el resto de aminoácidos.

En el músculo esquelético, los grupos amino en exceso se transfieren al piruvato donde forman alanina, otra molécula importante en el transporte de grupos amino hasta el hígado.

Empezaremos ahora una explicación sobre la degradación de las proteínas de la dieta, seguida de una descripción general de los destinos metabólicos de los grupos amino.

La proteína de la dieta se degrada enzimáticamente a aminoácidos

En los seres humanos, la degradación de las proteínas ingeridas a sus aminoácidos constituyentes tiene lugar en el tracto gastrointestinal. La entrada de proteína de la dieta en el estómago estimula la secreción de la hormona **gastrina** por la mu-

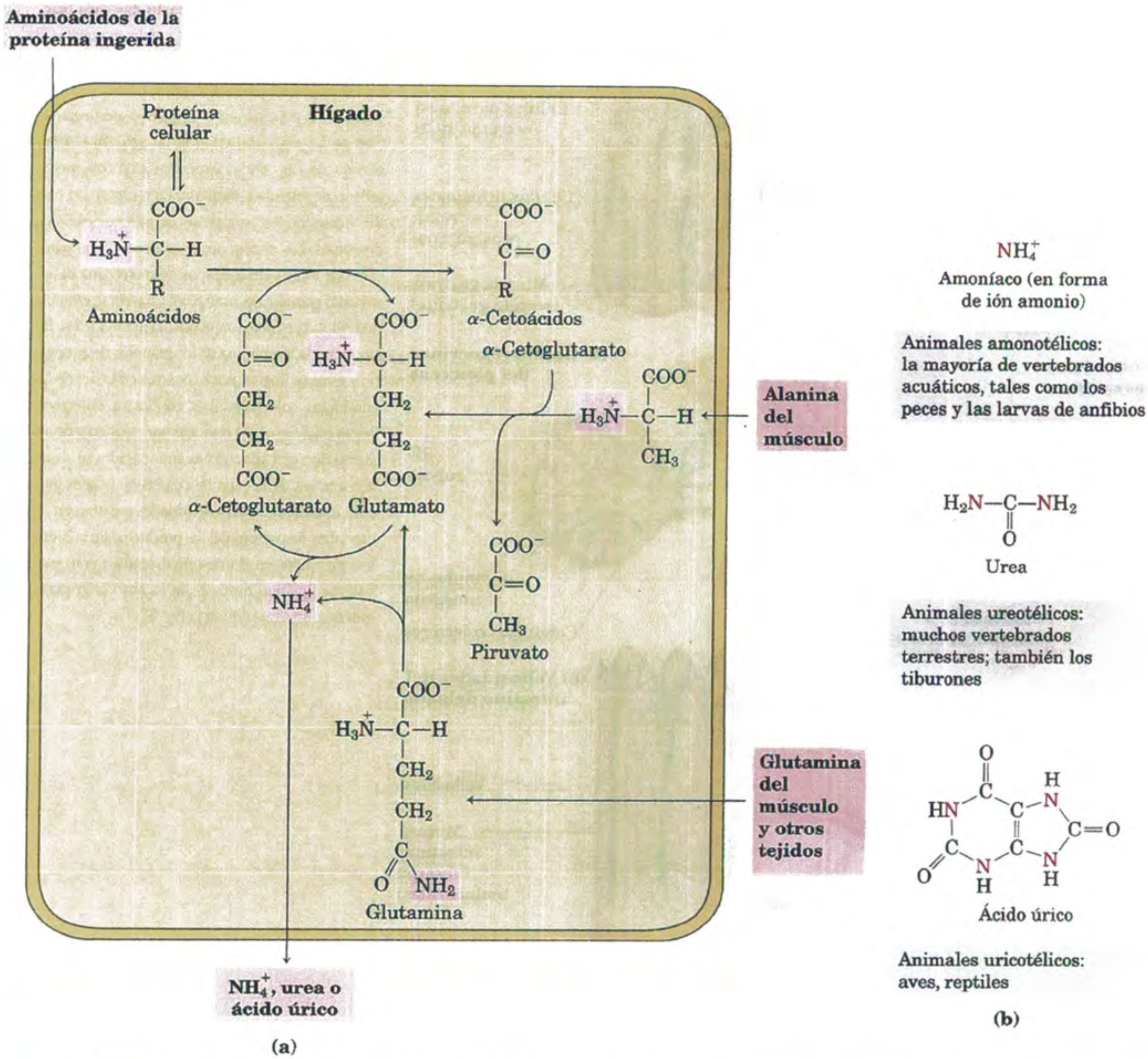


FIGURA 18–2 Catabolismo del grupo amino. **(a)** Visión general del catabolismo del grupo amino (sombreado) en el hígado de vertebrados. **(b)** Formas de excreción del nitrógeno. El exceso de NH_4^+ se excreta en forma de amoníaco (microbios, peces óseos), urea (la mayor parte de vertebrados terrestres), o ácido úrico (aves y reptiles terrestres). Observe que los átomos de carbono de la urea y el ácido úrico están muy oxidados; el organismo sólo desecha el carbono tras extraer la mayor parte de su energía de oxidación disponible.

cosa gástrica, la cual, a su vez, estimula la secreción de ácido clorhídrico por las células parietales y pepsinógeno por las células principales de las glándulas gástricas **(Fig. 18–3a)**. El jugo gástrico ácido (pH 1,0 a 2,5) es tanto un antiséptico, que mata la mayor parte de bacterias y células foráneas, como un agente desnaturalizante, que despliega las proteínas globulares y hace que sus enlaces peptídicos internos sean más asequibles a la hidrólisis enzimática. El **pepsinógeno** (M_r 40.554), un precursor inactivo o zimógeno (p. 227), se convierte en pepsina activa (M_r 34.614) por rotura autocatalítica (una rotura debida a la acción enzimática del propio pepsinógeno) que tiene lugar a pH bajo. En el estómago, la pepsina hidroliza las proteínas ingeridas en los enlaces peptídicos que están en el lado amino-terminal de los residuos aminoácidos aromáticos, Phe, Trp y Tyr (véase la Tabla 3–7), cortando cadenas polipeptídicas largas que dan una mezcla de péptidos más pequeños.

A medida que el contenido ácido del estómago pasa al intestino delgado, el pH bajo desencadena la secreción de la hormona **secretina** a la sangre. La secretina estimula el páncreas para que secrete bicarbonato al intestino delgado para neutralizar el HCl gástrico, incrementando el pH de manera abrupta hasta alrededor de 7. (Todas las secreciones pancreáticas pasan al intestino delgado a través del conducto pancreático.) La digestión de las proteínas continúa ahora en el intestino delgado. La entrada de aminoácidos en la parte superior del intestino (duodeno) produce la liberación a la sangre de la hormona **colecistoquinina,** que estimula la secreción de va-

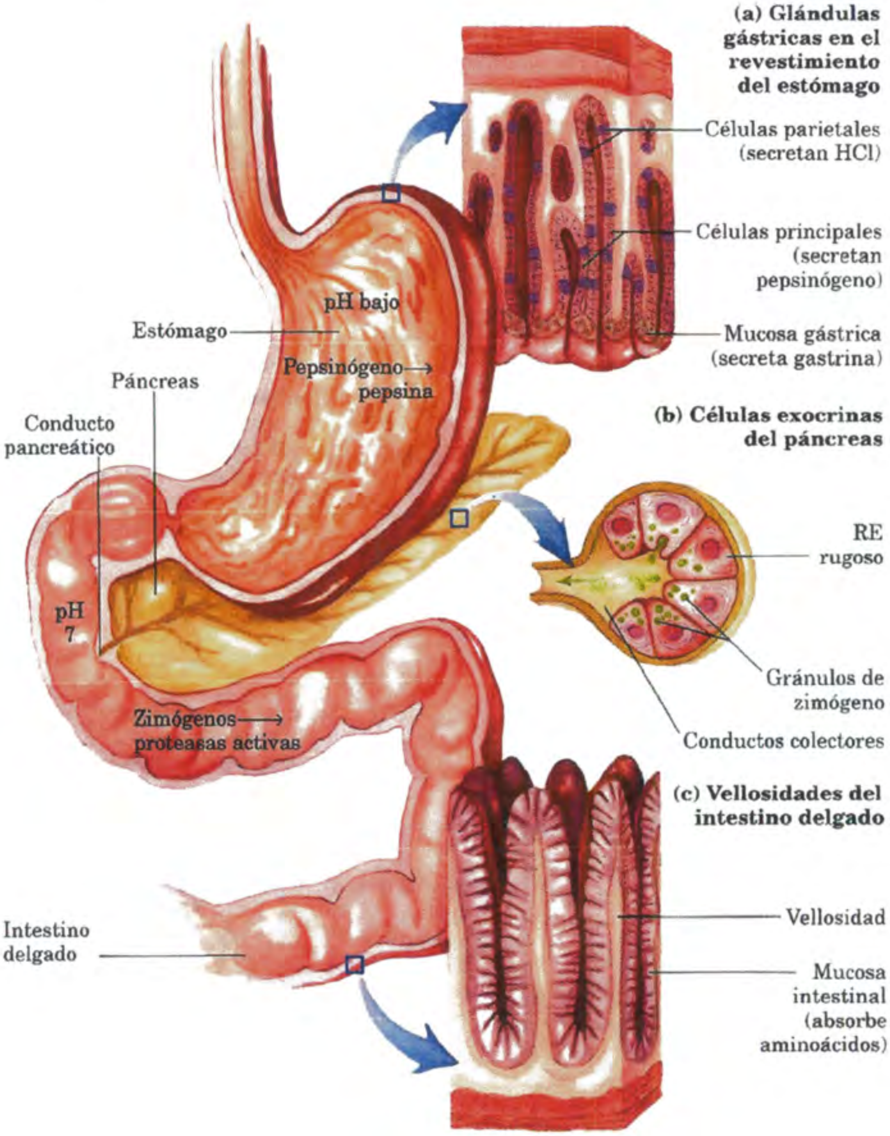


FIGURA 18–3 Porción del tracto digestivo (gastrointestinal) humano. (a) Las células parietales y las células principales de las glándulas gásticas secretan sus productos en respuesta a la hormona gastrina. La pepsina inicia el proceso de degradación de las proteínas en el estómago. (b) El citoplasma de las células exocrinas está totalmente relleno de retículo endoplasmático rugoso, el sitio de síntesis de los zimógenos de muchos enzimas digestivos. Los zimógenos se concentran en partículas de transporte rodeadas de membrana denominadas gránulos de zimógeno. Cuando se estimula una célula exocrina, su membrana plasmática se fusiona con la membrana de los gránulos de zimógeno y éstos se liberan por exocitosis en la luz de los conductos colectores. Los conductos colectores llegan finalmente al conducto pancreático y de ahí al intestino delgado. (c) Los aminoácidos se absorben a través de la capa de células epiteliales (mucosa intestinal) de las vellosidades y entran en los capilares. Recuerde que los productos de la hidrólisis de lípidos en el intestino delgado entran en el sistema linfático después de la absorción por la mucosa intestinal (véase la Fig. 17-1).

rios enzimas pancreáticos con actividad óptima a pH entre 7 y 8. El **tripsinógeno,** el **quimotripsinógeno** y las **procarboxipeptidasas A** y **B** (los zimógenos de la **tripsina,** la **quimotripsina** y las **carboxipeptidasas A** y **B**) se sintetizan y excretan por las células exocrinas del páncreas (Fig. 18–3b). El tripsinógeno se convierte en su forma activa, tripsina, por la **enteropeptidasa,** un enzima proteolítico secretado por las células intestinales. La tripsina libre cataliza después la conversión de más tripsinógeno en tripsina (véase la Fig. 6–38). La tripsina activa también el quimotripsinógeno, las procarboxipeptidasas y la proelastasa.

¿Por qué este complicado mecanismo para obtener enzimas digestivos activos en el tracto gastrointestinal? La síntesis de los enzimas en forma de precursores inactivos protege a las células exocrinas de un ataque proteolítico destructor. El páncreas se autoprotege además contra la propia digestión produciendo un inhibidor específico, una proteína denominada **inhibidor pancreático de tripsina** (p. 227), que evita de forma efectiva la producción prematura de enzimas proteolíticos activos dentro de las células pancreáticas.

La tripsina y la quimotripsina hidrolizan aún más los péptidos resultantes de la acción de la pepsina en el estómago. Esta fase de la digestión de proteínas se realiza muy eficientemente debido a que la pepsina, la tripsina y la quimotripsina tienen especificidad de aminoácidos diferentes (véase la Tabla 3–7). La degradación de los péptidos cortos en el intestino delgado se completa ahora con otras peptidasas intestinales. Éstas incluyen las carboxipeptidasas A y B (las dos son enzimas que contienen zinc), que eliminan residuos carboxilo-terminales sucesivos de los péptidos, y una **aminopeptidasa** que hidroliza residuos amino-terminales sucesivos de péptidos cortos. La mezcla resultante de aminoácidos libres se transporta a las células epiteliales que cubren el intestino delgado (Fig. 18–3c) a través de las cuales los aminoácidos entran en los capilares sanguíneos en las vellosidades y se transportan al hígado. En los seres humanos, la mayor parte de las proteínas globulares de origen animal se hidrolizan casi completamente a aminoácidos en el tracto gastrointestinal, pero algunas proteínas fibrosas, tales como la queratina, sólo son parcialmente digeridas. Además, el contenido proteico de algunos alimentos

vegetales está protegido contra la degradación por cáscaras de celulosa no digeribles.

La **pancreatitis aguda** es una grave enfermedad producida por la obstrucción de la vía normal mediante la cual las secreciones pancreáticas entran en el intestino. Los zimógenos de los enzimas proteolíticos se convierten prematuramente en sus formas catalíticamente activas, *dentro* de las células pancreáticas, y atacan al propio tejido pancreático, causando una destrucción seria y muy dolorosa del órgano, que puede ser mortal. ■

El piridoxal fosfato participa en la transferencia de grupos α-amino al α-cetoglutarato

El primer paso del catabolismo de la mayoría de L-aminoácidos, una vez han llegado al hígado, es la eliminación de los grupos α-amino, catalizada por enzimas denominados **aminotransferasas** o **transaminasas.** En estas reacciones de **transaminación,** el grupo α-amino se transfiere al átomo de carbono α del α-cetoglutarato, dejando el correspondiente α-cetoácido análogo del aminoácido **(Fig. 18–4)**. En estas reacciones no se produce una desaminación neta (es decir, pérdida de grupos amino), porque el α-cetoglutarato se amina a la vez que se desamina el α-aminoácido. El efecto de las reacciones de transaminación consiste en recoger los grupos amino de muchos aminoácidos diferentes en forma de L-glutamato. El glutamato funciona a continuación como dador de grupos amino tanto para rutas biosintéticas como para rutas de excreción que conducen a la eliminación de productos nitrogenados de desecho.

Las células contienen varios tipos de aminotransferasas. Muchas de ellas son específicas para el α-cetoglutarato como aceptor de grupos amino, pero en cambio difieren en su especificidad para el L-aminoácido. Estos enzimas se nombran en función del dador del grupo amino (así por ejemplo, se habla de alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa). Las reacciones catalizadas por las aminotransferasas son libremente reversibles y tienen una constante de equilibrio de alrededor de 1,0 ($\Delta G' \approx 0$ kJ/mol).

Todas las aminotransferasas tienen el mismo grupo prostético y un mismo mecanismo de reacción. El grupo prostético es el **piridoxal fosfato (PLP),** forma coenzimática de la piridoxina o vitamina B_6. El piridoxal fosfato apareció en el Capítulo 15, como coenzima de la reacción de la glucógeno fosforilasa. No obstante, su papel en aquella reacción no es representativo de su función coenzimática usual. Su papel principal en las células tiene lugar en el metabolismo de moléculas con grupos amino.

El piridoxal fosfato funciona como un transportador intermedio de grupos amino en el sitio activo de las aminotransferasas. Experimenta transformaciones reversibles entre su forma aldehído, piridoxal fosfato, que puede aceptar un grupo amino, y su forma aminada, piridoxamina fosfato, que puede ceder su grupo amino a un α-cetoácido **(Fig. 18–5a)**. El piridoxal fosfato está generalmente unido de manera covalente al sitio activo del enzima a través de un enlace de tipo aldimino (base de Schiff) al grupo ϵ-amino de un residuo Lys (Fig. 18–5b, d).

El piridoxal fosfato interviene en una serie de reacciones de los carbonos α, β y γ (C-2 a C-4) de los aminoácidos. Las reacciones en el carbono α **(Fig. 18–6)** incluyen racemizaciones (interconversión de L- y D-aminoácidos) y descarboxilaciones, además de las transaminaciones. El piridoxal fosfato juega el mismo papel químico en todas estas reacciones. Se rompe uno de los enlaces con el carbono α del sustrato eliminando un protón o un grupo carboxilo. El par electrónico que queda libre sobre el carbono α forma un carbanión muy inestable, pero el piridoxal fosfato lo estabiliza por resonancia (Fig. 18–6, recuadro). La estructura altamente conjugada del PLP (un sumidero electrónico) permite la deslocalización de la carga negativa.

Las aminotransferasas (Fig. 18–5) son ejemplos clásicos de enzimas que catalizan reacciones bimoleculares Ping-Pong (véase la Fig. 6-13b), en las que el primer sustrato reacciona, y a continuación el producto ha de abandonar el centro activo antes de que se pueda unir el segundo sustrato. Así, el aminoácido entrante se une al sitio activo, cede su grupo amino al piridoxal fosfato y sale en forma de α-cetoácido. A continuación se une el α-cetoácido entrante, acepta el grupo amino de la piridoxamina fosfato y sale en forma de aminoácido. Tal como se describe en el Recuadro 18–1 en la página 678, la medida de las concentraciones de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa en el suero sanguíneo es importante en algunos diagnósticos médicos.

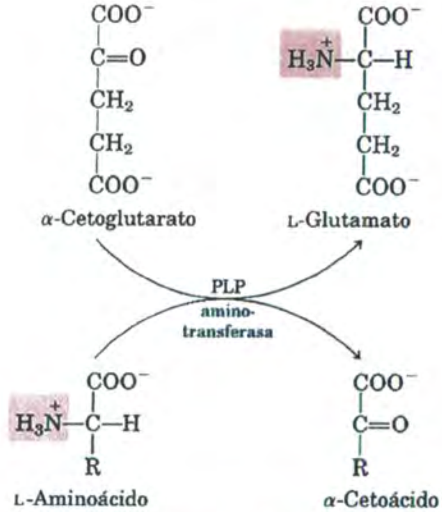


FIGURA 18–4 Transaminación catalizada enzimáticamente. En las reacciones de muchas aminotransferasas el α-cetoglutarato es el aceptor del grupo amino. Todas las aminotransferasas utilizan el piridoxal fosfato (PLP) como cofactor. Aunque la reacción se muestra aquí en la dirección de transferencia del grupo amino al α-cetoglutarato, es fácilmente reversible.

El glutamato libera su grupo amino en forma de amoníaco en el hígado

Tal como hemos visto, los grupos amino de muchos α-aminoácidos se recogen en el hígado en forma del grupo amino de moléculas de L-glutamato. A continuación estos grupos amino han de eliminarse del glutamato para prepararlos para la ex-

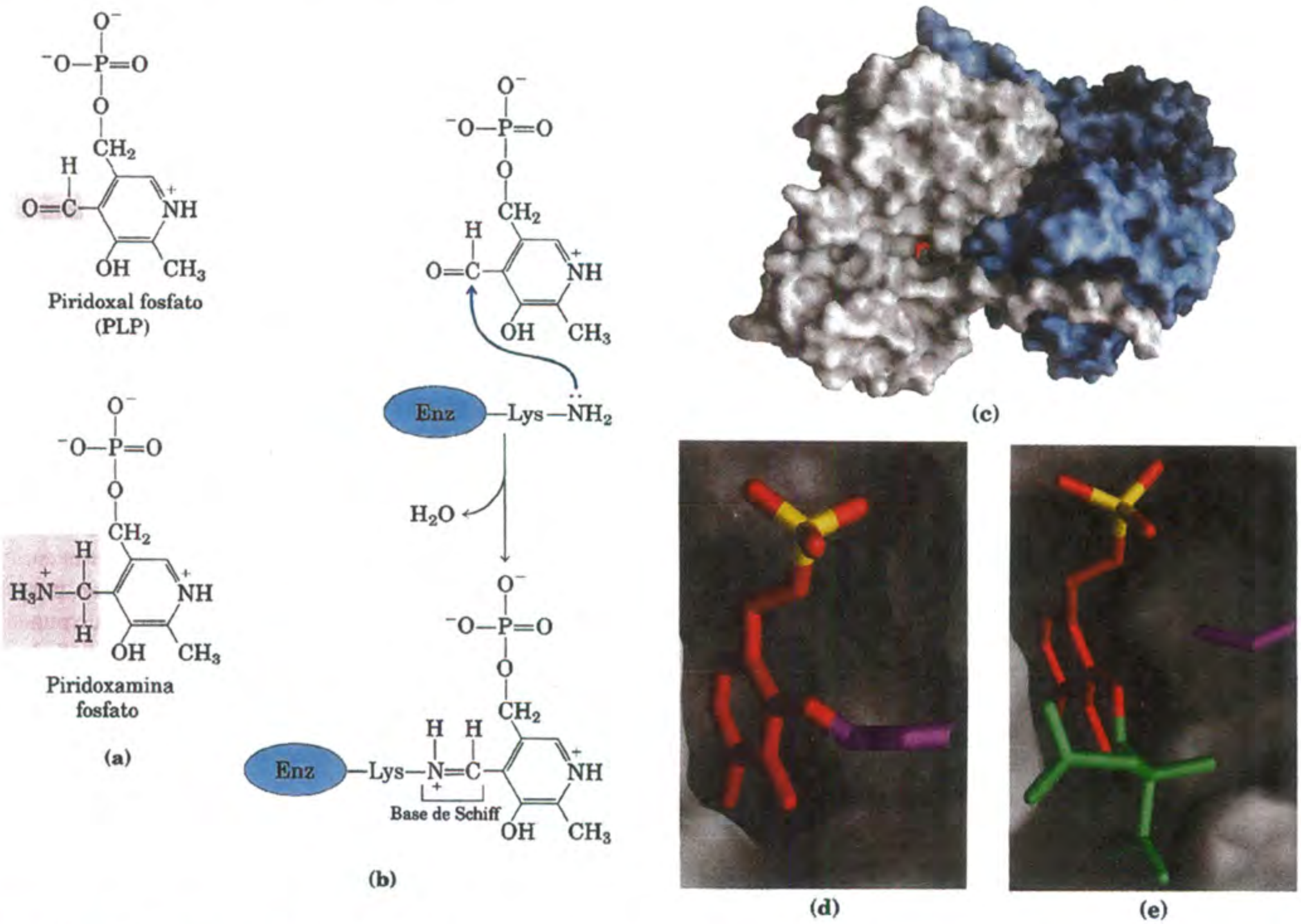


FIGURA 18–5 Piridoxal fosfato, grupo prostético de las aminotransferasas. **(a)** El piridoxal fosfato (PLP) y su forma aminada, piridoxamina fosfato, son los coenzimas, fuertemente unidos, de las aminotransferasas. Los grupos funcionales están sombreados. **(b)** El piridoxal fosfato se une al enzima mediante interacciones no covalentes y una unión por base de Schiff (aldimina) con un residuo Lys del sitio activo. Los pasos para la formación de la base de Schiff entre una amina primaria y un grupo carbonilo se detallan en la Figura 14–5. **(c)** PLP (en rojo) unido a uno de los dos sitios activos del enzima dimérico aspartato aminotransferasa, una aminotransferasa típica; **(d)** vista ampliada del sitio activo, con el PLP (en rojo, con el fósforo en amarillo) unido por enlace aldimina con la cadena lateral de la Lys^{258} (púrpura); **(e)** otra vista ampliada del sitio activo, con el PLP unido al análogo del sustrato 2-metilaspartato (en verde) vía una base de Schiff (PDB ID 1AJS).

RECUADRO 18–1 MEDICINA Determinación de lesiones tisulares

El análisis de ciertas actividades enzimáticas en el suero sanguíneo proporciona información diagnóstica útil sobre diversas condiciones patológicas.

La alanina aminotransferasa (ALT; también denominada glutamato-piruvato transaminasa, GPT) y la aspartato aminotransferasa (AST; también denominada glutamato-oxalacetato transaminasa, GOT) son importantes para el diagnóstico de lesiones cardíacas y hepáticas, causadas por ataque de corazón, toxicidad de fármacos o infección. Tras un ataque al corazón, diversos enzimas, incluidas estas aminotransferasas, escapan de las células cardíacas lesionadas al torrente circulatorio. La medida de la concentración en el suero sanguíneo de ambas aminotransferasas con las pruebas de la SGPT y SGOT (S de suero) —y de otro enzima, la **creatina quinasa,** con la prueba de la SCK— da información sobre la gravedad de la lesión. La creatina quinasa es el primer enzima cardíaco que aparece en la sangre después de un ataque de corazón; también desaparece muy rápidamente de la sangre. La GOT es la siguiente en aparecer y la GPT lo hace más tarde. La lactato deshidrogenasa también escapa desde el músculo cardíaco lesionado o anaeróbico.

Las pruebas de la SGOT y la SGPT también son importantes en medicina del trabajo para determinar si las personas expuestas a tetracloruro de carbono, cloroformo u otros disolventes industriales han sufrido lesión hepática. La degeneración del hígado producida por estos disolventes va acompañada del paso a la sangre de diversos enzimas de los hepatocitos dañados. Las aminotransferasas son de gran utilidad en el control de las personas expuestas a estos compuestos químicos debido a que tienen una actividad elevada en el hígado, por lo que es probable que se encuentren entre las proteínas vertidas por los hepatocitos dañados; además, su actividad se puede detectar a muy bajas concentraciones.

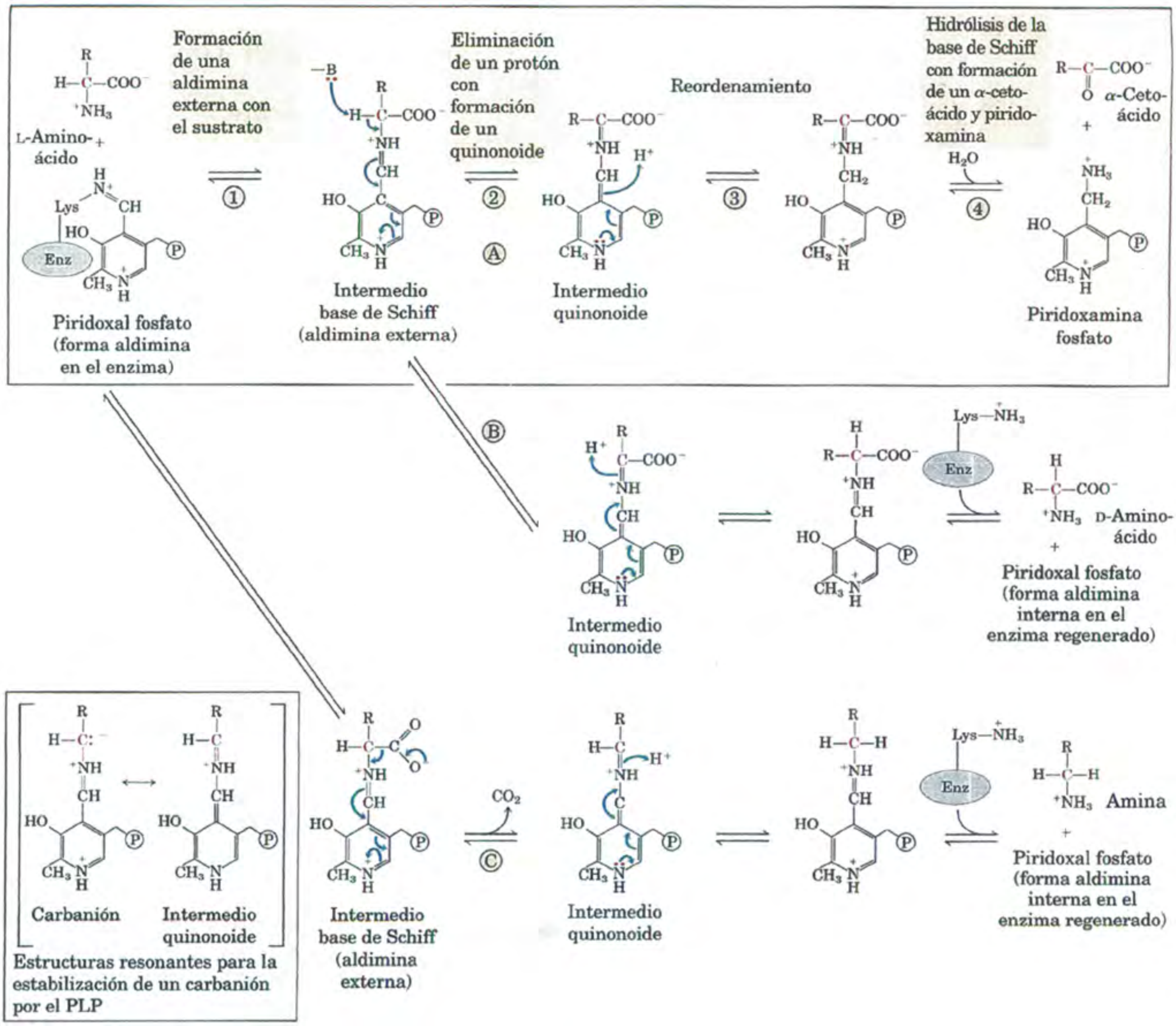


FIGURA DE MECANISMO 18–6 Algunas de las transformaciones en el carbono α de aminoácidos facilitadas por el piridoxal fosfato. El piridoxal fosfato se encuentra generalmente unido al enzima por medio de una base de Schiff, también llamada aldimina. Esta forma activada del PLP se transamina fácilmente con formación de una nueva base de Schiff (aldimina externa) entre el grupo α-amino del aminoácido sustrato. Se muestran tres destinos alternativos para la aldimina externa: (A) transaminación, (B) racemización y (C) descarboxilación. La base de Schiff formada entre el PLP y el aminoácido está conjugada con el anillo de piridina, que actúa como un sumidero electrónico que permite la deslocalización de un par electrónico para evitar la formación de un carbanión inestable sobre el carbono α (recuadro). En los tres tipos de reacciones interviene un intermedio quinonoide. La ruta de la transaminación (A) es especialmente importante en las rutas descritas en este capítulo. La ruta resaltada aquí (mostrada de izquierda a derecha) sólo representa una parte de la reacción global catalizada por las aminotransferasas. Para completar el proceso, un segundo α-cetoácido reemplaza el que se ha liberado y se convierte en aminoácido en una inversión de los pasos de reacción (de derecha a izquierda). El piridoxal fosfato interviene también en determinadas reacciones en los carbonos β y γ de algunos aminoácidos (no se muestra). **Mecanismos de reacción del piridoxal fosfato**

creción. En los hepatocitos, el glutamato se transporta desde el citosol a la mitocondria, en donde experimenta **desaminación oxidativa** catalizada por la **L-glutamato deshidrogenasa** (M_r 330.000). En los mamíferos, este enzima se encuentra en la matriz mitocondrial. Es el único enzima que puede utilizar tanto NAD^+ como $NADP^+$ como aceptor de los equivalentes de reducción **(Fig. 18–7)**.

La acción combinada de una aminotransferasa y la glutamato deshidrogenasa se conoce como **transdesaminación.** Algunos aminoácidos se saltan la ruta de transdesaminación y experimentan desaminación oxidativa directa. En la Sección 18.2 se explica con detalle el destino del NH_4^+ producido por cualquiera de estos procesos de desaminación. El α-cetoglutarato formado a partir de la desaminación del glutamato puede utilizarse en el ciclo del ácido cítrico y para la síntesis de glucosa.

La glutamato deshidrogenasa actúa en una importante intersección de los metabolismos del carbono y del nitrógeno. Es un enzima alostérico con seis subunidades idénticas y su activi-

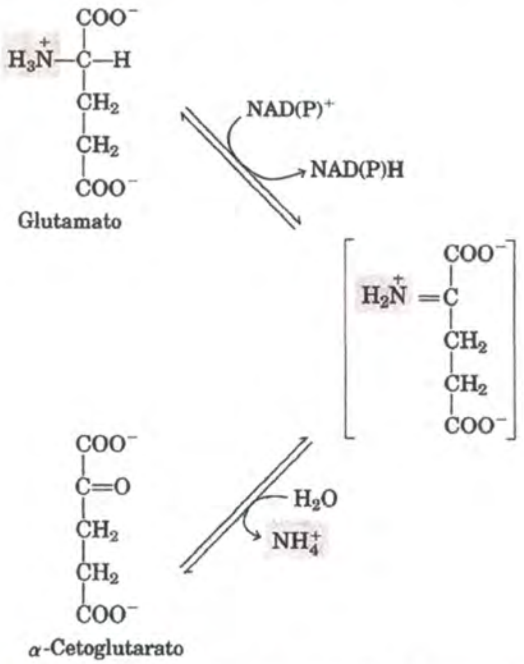


FIGURA 18–7 Reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa. La glutamato deshidrogenasa hepática de los mamíferos tiene la capacidad poco común de utilizar tanto NAD^+ como $NADP^+$ como cofactor. Las glutamato deshidrogenasas de las plantas y microorganismos son generalmente específicas para el uno o el otro. El enzima de los mamíferos está regulado alostéricamente por GTP y ADP.

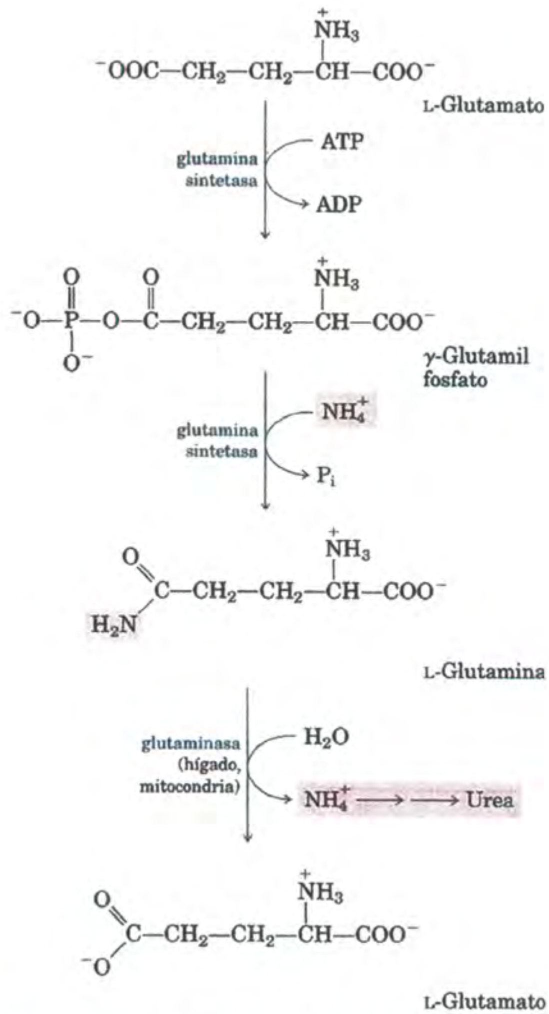


FIGURA 18–8 Transporte de amoníaco en forma de glutamina. El exceso de amoníaco de los tejidos se adiciona al glutamato en forma de glutamina, un proceso catalizado por la glutamina sintetasa. Después de su transporte a través de la sangre la glutamina entra en el hígado donde el enzima glutaminasa libera NH_4^+ en la mitocondria.

dad está influida por un complicado conjunto de moduladores alostéricos. Los mejor estudiados son el modulador positivo ADP y el modulador negativo GTP. No se ha aclarado con detalle la explicación metabólica de este patrón de regulación. Las mutaciones que alteran el sitio alósterico de unión de GTP o que causan de alguna otra forma la activación permanente de la glutamato deshidrogenasa, conducen a un trastorno genético humano denominado síndrome de hiperinsulinismo-hiperamonemia, que se caracteriza por niveles elevados de amoníaco en la sangre acompañados de hipoglucemia.

La glutamina transporta amoníaco en el torrente circulatorio

El amoníaco es muy tóxico para los tejidos animales (más adelante examinaremos algunas posibles razones de su toxicidad), por lo que sus niveles en sangre están regulados. En muchos tejidos, incluido el cerebro, se genera amoníaco libre a través de algunos procesos tales como la degradación de nucleótidos. En la mayoría de animales, gran parte del amoníaco libre se convierte en un compuesto no tóxico antes de ser exportado de los tejidos extrahepáticos a la sangre y transportado al hígado o los riñones. El glutamato, que es tan importante para el metabolismo *intracelular* de grupos amino, es sustituido por la L-glutamina para esta función de transporte. El amoníaco libre producido en los tejidos se combina con glutamato, dando glutamina por acción de la **glutamina sintetasa.** Esta reacción requiere ATP y tiene lugar en dos pasos **(Fig. 18–8)**. En el primer paso, el glutamato y el ATP reaccionan formando ADP y un intermedio γ-glutamil fosfato que reacciona a continuación con el amoníaco, produciendo glutamina y fosfato inorgánico. La glutamina constituye una forma de transporte no tóxica del amoníaco; normalmente está presente en la sangre en concentraciones mucho mayores que otros aminoácidos. La glutamina sirve además de *fuente de grupos amino* en diversas reacciones biosintéticas. La glutamina sintetasa está presente en todos los organismos, desempeñando siempre un papel metabólico central. En los microorganismos, este enzima constituye un portal esencial para la entrada del nitrógeno fijado en los sistemas biológicos. (Las funciones de la glutamina y de la glutamina sintetasa en el metabolismo se volverán a tratar en el Capítulo 22.)

En la mayoría de animales terrestres, la glutamina en exceso respecto a la necesaria para la biosíntesis se transporta por la sangre al intestino, al hígado y a los riñones para su tratamiento. En estos tejidos el nitrógeno amídico se libera en forma de ión amonio dentro de las mitocondrias, en donde el

enzima **glutaminasa** convierte la glutamina en glutamato y NH_4^+ (Fig. 18–8). El NH_4^+ del intestino y del riñón se transporta por la sangre al hígado. En el hígado, el amoníaco de todas estas fuentes se elimina mediante la síntesis de urea. Parte del glutamato producido en la reacción de la glutaminasa puede ser aún modificado en el hígado por la glutamato deshidrogenasa, liberando más amoníaco y produciendo esqueletos carbonados para ser utilizados como combustible metabólico. No obstante, la mayor parte del glutamato entra en las reacciones de transaminación necesarias para la biosíntesis de aminoácidos y otros procesos (Capítulo 22).

En la acidosis metabólica (p. 667) los riñones incrementan la modificación de la glutamina. No todo el exceso de NH_4^+ así producido se libera a la sangre o se convierte en urea, sino que se excreta directamente a la orina: una parte se excreta directamente a la orina. En el riñón, el NH_4^+ forma sales con ácidos metabólicos, facilitando su eliminación en la orina. La descarboxilación del α-cetoglutarato en el ciclo del ácido cítrico proporciona también bicarbonato que puede servir como tampón en el plasma sanguíneo. En conjunto, estos efectos del metabolismo de la glutamina en los riñones tienden a contrarrestar la acidosis. ■

La alanina transporta amoníaco desde los músculos esqueléticos al hígado

La alanina también juega un papel especial en el transporte de grupos amino al hígado en una forma no tóxica, mediante una ruta denominada **ciclo de la glucosa-alanina (Fig. 18–9)**. En el músculo y en algunos otros tejidos que degradan aminoácidos como combustible, los grupos amino se recogen en forma de glutamato por transaminación (Fig. 18–2a). El glutamato puede entonces convertirse en glutamina para su transporte al hígado tal como se ha descrito, o puede transferir su grupo α-amino al piruvato, un producto de la glucólisis muscular fácilmente asequible, por acción de la **alanina aminotransferasa** (Fig. 18–9). La alanina así formada pasa a la sangre y es transportada al hígado. En el citosol de los hepatocitos, la alanina aminotransferasa transfiere el grupo amino de la alanina al α-cetoglutarato, formando piruvato y glutamato. El glutamato puede entrar en las mitocondrias, donde la reacción de la glutamato deshidrogenasa libera NH_4^+ (Fig. 18–7), o puede experimentar transaminación con oxalacetato, formando aspartato que, tal como veremos, es otro dador de nitrógeno en la síntesis de urea.

La utilización de alanina para transportar amoníaco desde el músculo esquelético al hígado es otro ejemplo de la economía intrínseca de los organismos vivos. Los músculos esqueléticos sometidos a contracción vigorosa operan de forma anaeróbica, produciendo piruvato y lactato a partir de la glucólisis, además de amoníaco a partir de la degradación de proteínas. Estos productos han de ir a parar al hígado, en donde el piruvato y el lactato se incorporan a la glucosa, que es devuelta a los músculos, y el amoníaco se convierte en urea para su excreción. El ciclo de la glucosa-alanina, junto con el ciclo de Cori (véase el Recuadro 14–2 y la Fig. 23–20), consiguen esta transacción. La carga energética de la gluconeogénesis se impone así al hígado y no al músculo, con lo que todo el ATP disponible en el músculo se dedica a la contracción muscular.

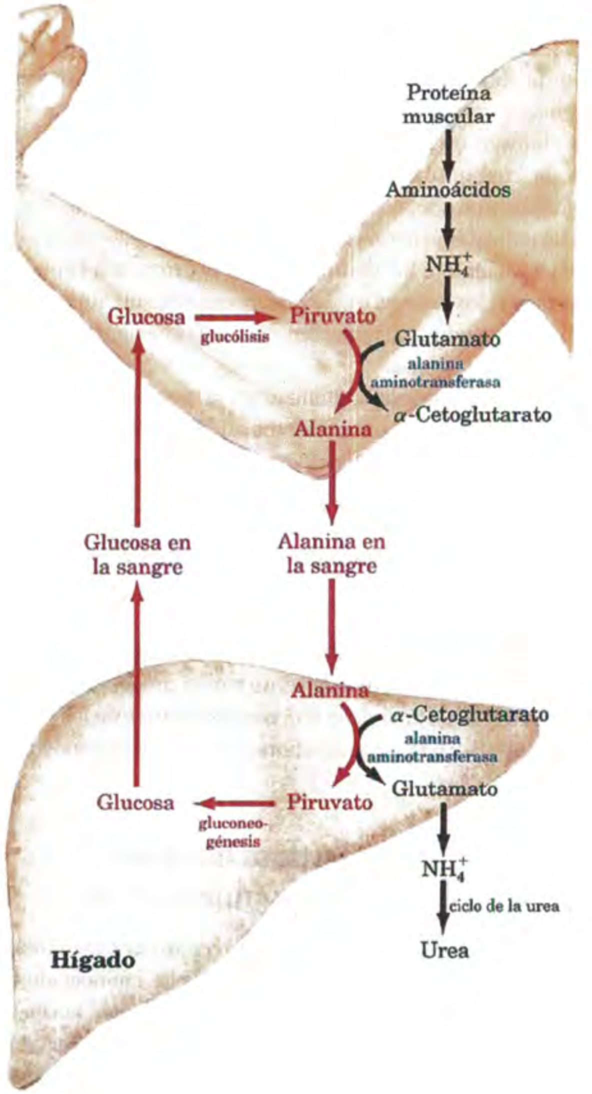


FIGURA 18–9 Ciclo de la glucosa-alanina. La alanina actúa como transportador de amoníaco y del esqueleto carbonado del piruvato desde el músculo esquelético al hígado. El amoníaco se excreta y el piruvato se utiliza para producir glucosa, que vuelve al músculo.

El amoníaco es tóxico para los animales

La producción catabólica de amoníaco plantea un problema bioquímico serio debido a que el amoníaco es muy tóxico. No se conoce bien la base molecular de esta toxicidad. Las fases terminales de la intoxicación por amoníaco en los seres humanos se caracterizan por la aparición de un estado comatoso acompañado de edema cerebral (un aumento del contenido de agua en el cerebro) y un aumento de la presión craneal, por lo que las investigaciones y especulaciones sobre la toxicidad del amoníaco se han centrado en este tejido. Las especulaciones se centran en un posible agotamiento del ATP en las células cerebrales.

Para liberar al citosol del exceso de amoníaco es necesaria la aminación reductora del α-cetoglutarato a glutamato por la glutamato deshidrogenasa (el inverso de la reacción descrita

anteriormente; Fig. 18–7) y la conversión del glutamato en glutamina por la glutamina sintetasa. Estos dos enzimas se hallan a concentraciones elevadas en el cerebro, aunque la reacción de la glutamina sintetasa representa con casi toda certeza la vía más importante para la eliminación de amoníaco. Los niveles elevados de NH_4^+ conducen a niveles mayores de glutamina, la cual actúa como un soluto osmóticamente activo (osmolito) en los astrocitos del cerebro, células en forma de estrella del sistema nervioso que proporcionan nutrientes, sostén y aislamiento a las neuronas. Esto provoca una captación de agua por los astrocitos para mantener el equilibrio osmótico, lo que conduce al hinchamiento de las células y del cerebro que lleva al coma.

El agotamiento del glutamato en la reacción de la glutamina sintetasa puede tener efectos adicionales sobre el cerebro. El glutamato y su derivado γ-aminobutirato (GABA; véase la Fig. 22-29) son neurotransmisores importantes; la sensibilidad del cerebro al amoníaco podría ser reflejo de una desaparición de neurotransmisores además de cambios en el equilibrio osmótico. ■

Al cerrar esta discusión sobre el metabolismo del grupo amino, observe que hemos descrito varios procesos que depositan el exceso de amoníaco en las mitocondrias de los hepatocitos (Fig. 18–2). Pasaremos ahora a discutir el destino de este amoníaco.

RESUMEN 18.1 Destinos metabólicos de los grupos amino

- Una pequeña parte de la energía oxidativa en los seres humanos proviene del catabolismo de los aminoácidos. Los aminoácidos se obtienen en la degradación normal (reciclado) de las proteínas celulares, degradación de las proteínas ingeridas y degradación de las proteínas corporales en lugar de otras fuentes de combustible durante la inanición o en la diabetes mellitus no controlada.
- Las proteínas ingeridas son degradadas por proteasas en el estómago e intestino delgado. La mayoría de las proteasas se sintetizan inicialmente en forma de zimógenos inactivos.
- Una etapa temprana del catabolismo de los aminoácidos es la separación del grupo amino de su esqueleto carbonado. En la mayoría de casos el grupo amino se transfiere al α-cetoglutarato, formando glutamato. Esta reacción de transaminación requiere el coenzima piridoxal fosfato.
- El glutamato se transporta a las mitocondrias hepáticas, en donde la glutamato deshidrogenasa libera el grupo amino en forma de ión amonio (NH_4^+). El amoníaco formado en otros tejidos se transporta al hígado en forma del nitrógeno amídico de la glutamina o, en el transporte desde el músculo esquelético, como grupo amino de la alanina.
- El piruvato producido por desaminación de la alanina en el hígado se convierte en glucosa, la cual se vuelve a transportar al músculo como parte del ciclo de la glucosa-alanina.

18.2 Excreción del nitrógeno y ciclo de la urea

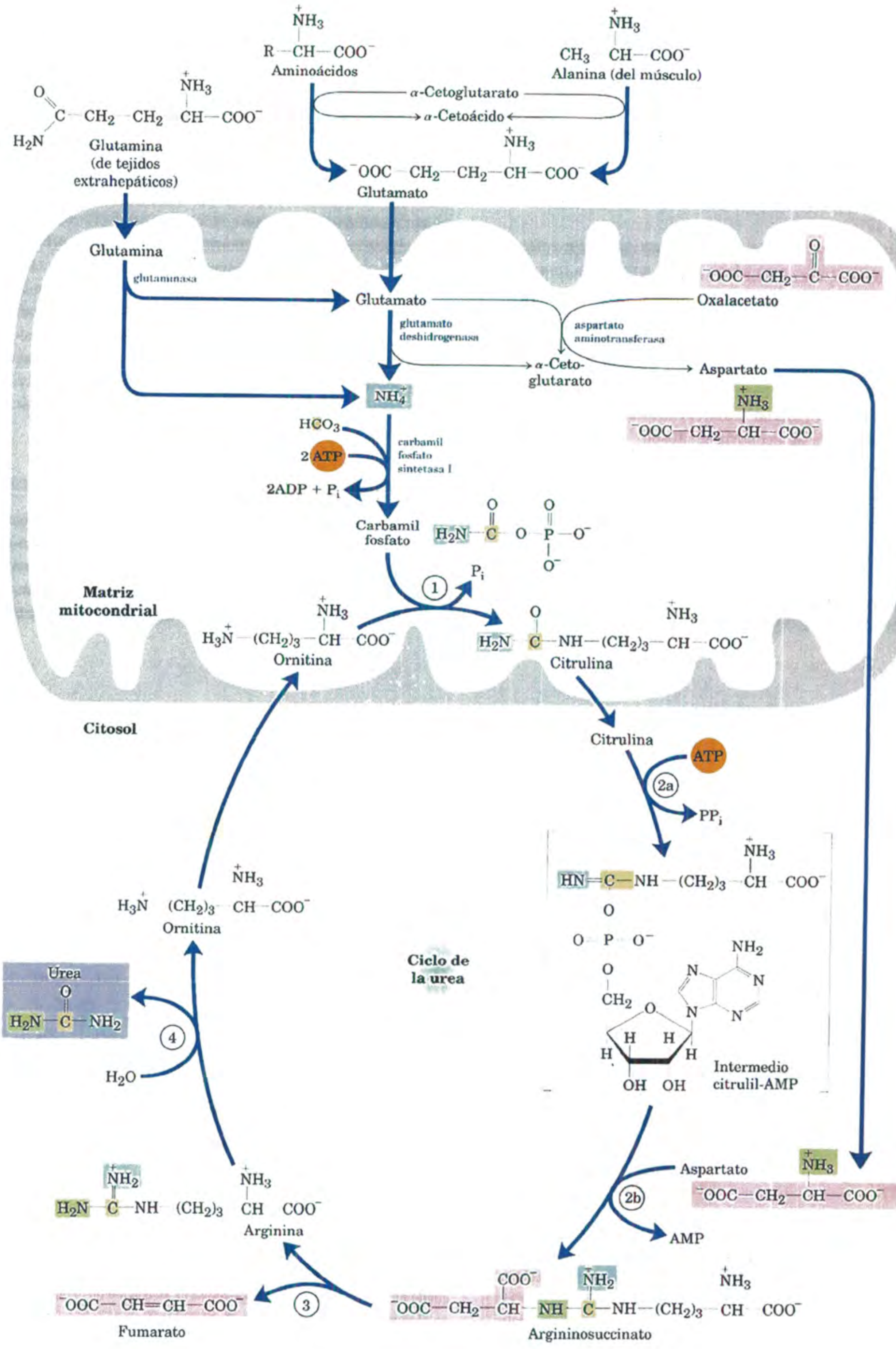
Si no se reutilizan para la síntesis de nuevos aminoácidos u otros productos nitrogenados, los grupos amino se canalizan a un único producto final de excreción **(Fig. 18–10)**. La mayoría de especies acuáticas, tales como los peces óseos, excretan el nitrógeno amínico en forma de amoníaco, por lo que se les llama animales **amonotélicos.** El amoníaco tóxico simplemente se diluye en el agua circundante. Los animales terrestres necesitan vías para la excreción del nitrógeno que minimicen tanto la toxicidad como la pérdida de agua. La mayoría de animales terrestres son **ureotélicos:** excretan el nitrógeno amínico en forma de urea; las aves y los reptiles son **uricotélicos:** excretan el nitrógeno amínico en forma de ácido úrico. (La ruta para la síntesis de ácido úrico se describe en la Figura 22–45.) Las plantas reciclan virtualmente todos los grupos amino, por lo que la excreción de nitrógeno sólo tiene lugar en circunstancias muy poco comunes.

En los organismos ureotélicos, el amoníaco depositado en las mitocondrias de los hepatocitos se convierte en urea mediante el **ciclo de la urea.** Esta ruta fue descubierta en 1932 por Hans Krebs (que más tarde también descubriría el ciclo del ácido cítrico) y un estudiante médico asociado, Kurt Henseleit. La producción de urea tiene lugar casi exclusivamente en el hígado y representa el destino de la mayor parte del amoníaco allí canalizado. La urea pasa al torrente sanguíneo y de ahí a los riñones, y se excreta en la orina. La producción de urea constituirá ahora el centro de nuestra atención.

La urea se produce a partir de amoníaco en cinco pasos enzimáticos

El ciclo de la urea empieza en el interior de las mitocondrias del hígado, si bien tres de los pasos posteriores tienen lugar en el citosol; por tanto, el ciclo abarca dos compartimientos celulares (Fig. 18–10). El primer grupo amino que entra en el ciclo de la urea proviene del amoníaco de la matriz mitocondrial, —NH_4^+, que es el resultado de las rutas antes descritas. Parte del amoníaco también llega al hígado vía vena porta desde el intestino, en donde se produce por oxidación bacteriana de ami-

FIGURA 18–10 Ciclo de la urea y reacciones que introducen grupos amino en el mismo. Los enzimas que catalizan estas reacciones (nombrados en el texto) se distribuyen entre la matriz mitocondrial y el citosol. Un grupo amino entra en el ciclo de la urea en forma de carbamil fosfato formado en la matriz; el otro entra como aspartato, formado en la matriz por transaminación del oxalacetato y el glutamato, catalizada por la aspartato aminotransferasa. El ciclo de la urea consta de cuatro pasos: (1) Formación de citrulina a partir de ornitina y carbamil fosfato (entrada del primer grupo amino); la citrulina pasa al citosol. (2) Formación de argininosuccinato a través de un intermedio citrulil-AMP (entrada del segundo grupo amino). (3) Formación de arginina a partir del argininosuccinato; esta reacción libera fumarato que entra en el ciclo del ácido cítrico. (4) Formación de urea; esta reacción también regenera la ornitina. Las vías mediante las cuales el NH_4^+ llega a la matriz mitocondrial de los hepatocitos se describieron en la Sección 18.1.


Aminoácidos
Alanina (del músculo)
α-Cetoglutarato
α-Cetoácido
Glutamina
(de tejidos
extrahepáticos)
Glutamato
Glutamina
glutaminasa
Glutamato
Oxalacetato
glutamato
deshidrogenasa
aspartato
aminotransferasa
α-Ceto-
glutarato
Aspartato
NH_4^+
HCO_3^-
2 ATP
carbamil
fosfato
sintetasa I
2ADP + P_i
Carbamil
fosfato
Matriz
mitocondrial
1
P_i
Ornitina
Citrulina
Citosol
Citrulina
ATP
2a
PP_i
Intermedio
citrulil-AMP
Ornitina
Ciclo de
la urea
Urea
4
H_2O
Aspartato
2b
AMP
Arginina
3
Fumarato
Argininosuccinato

noácidos. Cualquiera que sea su origen, el NH_4^+ generado en las mitocondrias hepáticas se utiliza inmediatamente, junto con el CO_2 (en forma de HCO_3^-) producido por la respiración mitocondrial, para dar carbamil fosfato en la matriz **(Fig. 18–11a**; véase también la Fig. 18–10). Esta reacción dependiente de ATP es catalizada por la **carbamil fosfato sintetasa I,** un enzima regulador (véase más adelante). La forma mitocondrial del enzima es distinta de la forma citosólica (II), que tiene una función diferente en la biosíntesis de pirimidinas (Capítulo 22).

El carbamil fosfato, que funciona como un dador activado del grupo carbamilo, entra ahora en el ciclo de la urea, que consta de cuatro pasos enzimáticos. En primer lugar, el carbamil fosfato cede su grupo carbamilo a la ornitina para formar citrulina y libera P_i (Fig. 18–10, paso ①). La ornitina desempeña un papel similar al del oxalacetato en el ciclo del ácido cítrico, aceptando material en cada vuelta del ciclo. La reacción está catalizada por la **ornitina transcarbamilasa,** y la citrulina formada pasa de la mitocondria al citosol.

El segundo grupo amino se introduce ahora a partir del aspartato (generado en la mitocondria por transaminación y transportado al citosol) mediante una reacción de condensación entre el grupo amino del aspartato y el grupo ureido (carbonilo) de la citrulina, que forma argininosuccinato (paso ② en la Fig. 18–10). Esta reacción citosólica, catalizada por la **argininosuccinato sintetasa,** requiere ATP y tiene lugar a través de un intermedio citrulil-AMP (Fig. 18–11b). A continuación se corta el argininosuccinato por la **argininosuccinasa** (paso ③ en la Fig. 18–10), para formar arginina libre y fumarato; este último entra en la mitocondria y se une a la reserva de intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Éste es el único paso reversible del ciclo de la urea. En la última reacción del ciclo de la urea (paso ④), el enzima citosólico **arginasa** corta la arginina, dando **urea** y ornitina. La ornitina es transportada a la mitocondria para iniciar otra vuelta del ciclo de la urea.

Tal como observamos en el Capítulo 16, los enzimas de muchas rutas metabólicas están agrupados (p. 619). El producto de un enzima se canaliza directamente al siguiente enzima de la vía. En el ciclo de la urea, los enzimas mitocondriales y citosólicos parecen estar agrupados de esta forma. La citrulina transportada al exterior de la mitocondria no se diluye en la reserva general de metabolitos del citosol, sino que pasa directamente al sitio activo de la argininosuccinato sintetasa. Esta canalización entre enzimas continúa para el argininosuccinato, la arginina y la ornitina. Sólo se libera la urea a la reserva general de metabolitos del citosol.

Los ciclos del ácido cítrico y de la urea pueden conectarse

Dado que el fumarato producido en la reacción de la argininosuccinasa es también un intermediario del ciclo del ácido cítrico, los ciclos están, en principio, interconectados en un proceso conocido como el "doble ciclo de Krebs" **(Fig. 18–12)**. Sin embargo, cada ciclo puede funcionar de manera independiente y la

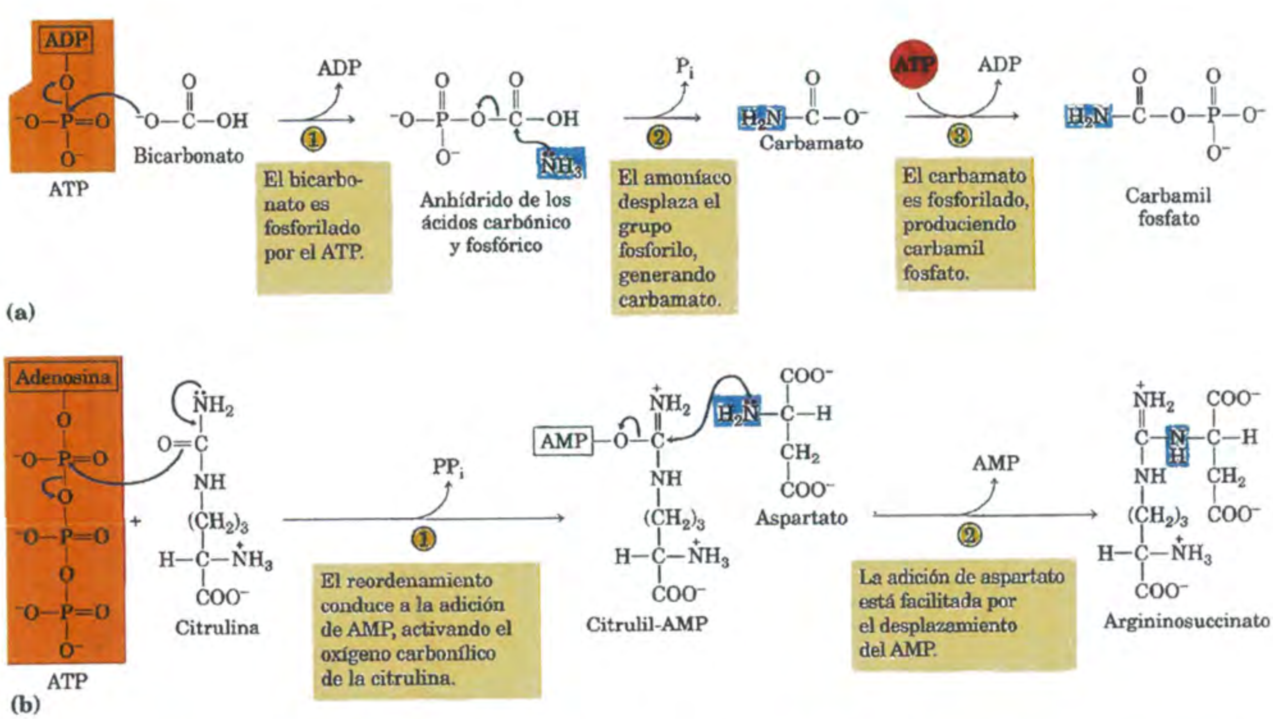


FIGURA DE MECANISMO 18–11 Reacciones de adquisición de nitrógeno en la síntesis de urea. Los nitrógenos de la urea se adquieren en dos reacciones que requieren ATP. **(a)** El primer nitrógeno del amoníaco entra en la reacción catalizada por la carbamil fosfato sintetasa I. Los grupos fosfato terminales de dos moléculas de ATP se utilizan para formar una molécula de carbamil fosfato. Dicho en otras palabras, en esta reacción hay dos pasos de activación (① y ③). **Mecanismo de la carbamil fosfato sintetasa I** **(b)** En la reacción catalizada por la argininosuccinato sintetasa, entra el segundo nitrógeno procedente del aspartato. La activación del oxígeno ureido en el paso ① prepara la adición de aspartato en el paso ②. **Mecanismo de la argininosuccinato sintetasa**

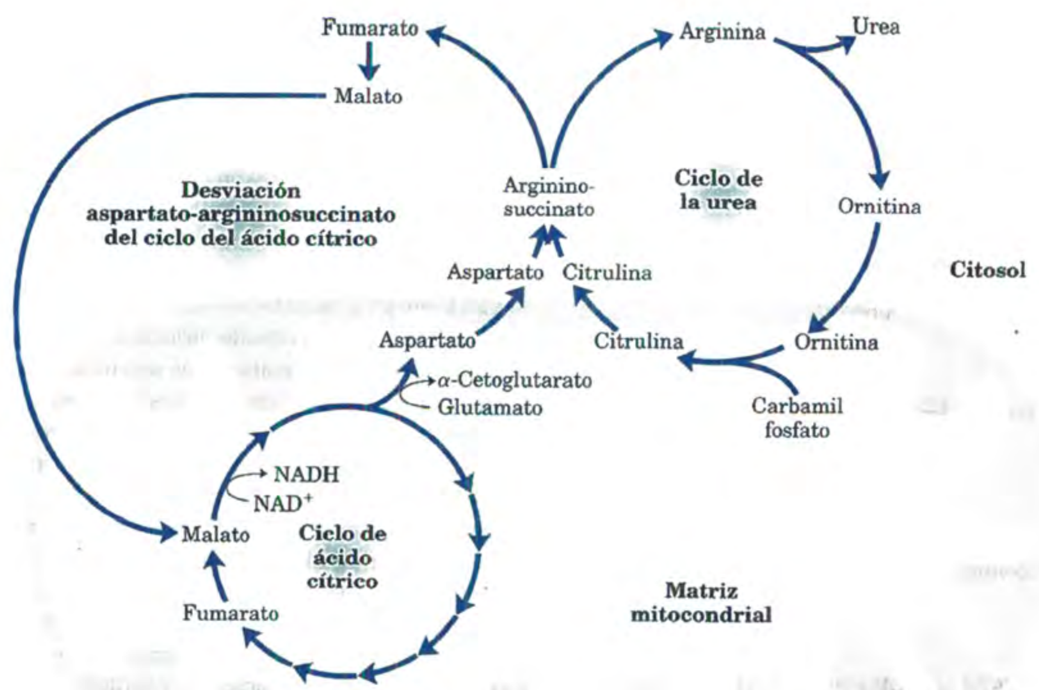


FIGURA 18–12 Conexiones entre el ciclo de la urea y el ciclo del ácido cítrico. Los ciclos interconectados han sido denominados el "doble ciclo (biciclo) de Krebs". El ciclo que conecta los ciclos del ácido cítrico y de la urea se denomina desviación del aspartato-argininosuccinato. Estas rutas conectan de forma efectiva los destinos de los grupos amino y los esqueletos carbonados de los aminoácidos. Las interconexiones son incluso más elaboradas de lo que sugieren las flechas. Por ejemplo, algunos de los enzimas del ciclo del ácido cítrico, tales como la fumarasa y la malato deshidrogenasa, tienen tanto isozimas mitocondriales como citosólicos. El fumarato producido en el citosol, ya sea por el ciclo de la urea, la biosíntesis de purinas u otros procesos, puede convertirse en malato citosólico, que se utiliza en el citosol o se transporta a la mitocondria (vía lanzadera del malato-aspartato; véase la Figura 19-29) para entrar en el ciclo del ácido cítrico.

comunicación entre ellos depende del transporte de intermediarios clave entre la mitocondria y el citosol. Varios enzimas del ciclo del ácido cítrico, incluida la fumarasa (fumarato hidratasa) y la malato deshidrogenasa (p. 628), también están presentes como isozimas en el citosol. El fumarato generado en la síntesis citosólica de arginina puede, por tanto, convertirse en malato en el citosol, y estos intermediarios pueden seguir siendo metabolizados en el citosol o ser transportados a las mitocondrias para su utilización en el ciclo del ácido cítrico. El aspartato formado en las mitocondrias por transaminación entre oxalacetato y glutamato puede ser transportado al citosol, en donde actúa como dador de nitrógeno en la reacción del ciclo de la urea catalizada por la argininosuccinato sintetasa. Estas reacciones, que constituyen la **desviación del aspartato-argininosuccinato,** proporcionan vínculos metabólicos entre las rutas separadas por las que se transforman los grupos amino y los esqueletos carbonados de los aminoácidos.

La actividad del ciclo de la urea está regulada a dos niveles

El flujo de nitrógeno a través del ciclo de la urea varía con la dieta de un individuo a otro. Cuando la dieta es mayoritariamente proteína, la utilización de los esqueletos carbonados de los aminoácidos como combustible da lugar a la producción de mucha urea a partir del exceso de grupos amino. Durante la inanición prolongada, en la que la degradación de proteína muscular empieza a suministrar gran parte de la energía metabólica del organismo, también aumenta de manera sustancial la producción de urea.

Estos cambios en la demanda de actividad del ciclo de la urea se consiguen a largo plazo mediante la regulación de las velocidades de síntesis de los cuatro enzimas del ciclo de la urea y de la carbamil fosfato sintetasa I en el hígado. Los cinco enzimas se sintetizan a velocidades más elevadas durante la inanición o en los animales con dietas muy ricas en proteínas que en animales bien alimentados con dietas que contienen principalmente glúcidos y grasas. Los animales con dietas carentes de proteínas producen niveles más bajos de los enzimas del ciclo de la urea.

En una escala de tiempo más corta, la regulación alostérica de al menos un enzima clave ajusta el flujo a través del ciclo de la urea. El primer enzima de la ruta, la carbamil fosfato sintetasa I, está activado alostéricamente por el ***N*-acetilglutamato,** que se sintetiza a partir de acetil-CoA y glutamato por la ***N*-acetilglutamato sintasa (Fig. 18–13)**. Este enzima cataliza el primer paso de la síntesis de novo de la arginina a partir de glutamato en plantas y microorganismos (véase la Fig. 22–10), pero en los mamíferos la actividad *N*-acetilglutamato sintasa en el hígado tiene una función puramente reguladora (los mamíferos carecen del resto de enzimas necesarios

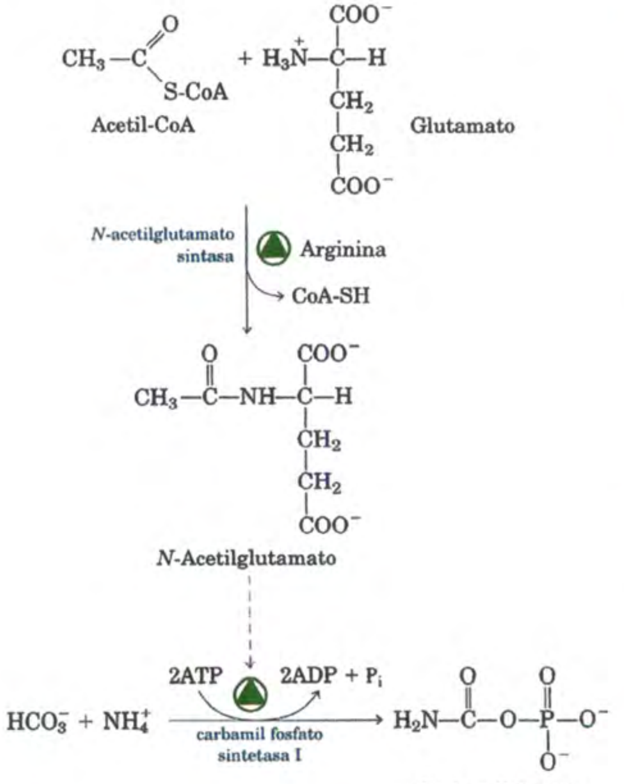


FIGURA 18–13 Síntesis de *N*-acetilglutamato y su activación por la carbamil fosfato sintetasa I.

para convertir el glutamato en arginina). Los niveles de estado estacionario del *N*-acetilglutamato vienen determinados por las concentraciones de glutamato y de acetil-CoA (los sustratos de la *N*-acetilglutamato sintasa) y de arginina (un activador de la *N*-acetilglutamato sintasa y, por consiguiente, un activador del ciclo de la urea).

Las interconexiones entre rutas reducen el coste energético de la síntesis de urea

Si se considera el ciclo de la urea aisladamente, la síntesis de una molécula de urea requiere cuatro grupos fosfato de alta energía (Fig. 18–10). Se requieren dos moléculas de ATP para producir el carbamil fosfato y un ATP para producir argininosuccinato. Este último ATP sufre una escisión del pirofosfato dando AMP y PP_i, que es hidrolizado a dos P_i. La ecuación global del ciclo de la urea es

$$2NH_4^+ + HCO_3^- + 3ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow \text{urea} + 2ADP^{3-} + 4P_i^{2-} + AMP^{2-} + 2H^+$$

Sin embargo, el ciclo de la urea también da lugar a una conversión neta de oxalacetato en fumarato (vía aspartato), y la regeneración del oxalacetato (Fig. 18–12) produce NADH en la reacción de la malato deshidrogenasa. Cada molécula de NADH puede generar hasta 2,5 ATP durante la respiración mitocondrial (Capítulo 19), reduciendo enormemente el coste energético global de la síntesis de urea.

Defectos genéticos en el ciclo de la urea pueden ser letales

Las personas con defectos genéticos en cualquiera de los enzimas que intervienen en la formación de urea no pueden tolerar una dieta rica en proteínas. Los aminoácidos ingeridos en exceso a los requerimientos diarios mínimos para la síntesis de proteínas se desaminan en el hígado, produciendo amoníaco libre que no puede ser convertido en urea y exportado a la sangre y, tal como hemos visto, el amoníaco es muy tóxico. La ausencia de un enzima del ciclo de la urea puede producir hiperamonemia o la acumulación de uno o más intermediarios del ciclo de la urea, según cual sea el enzima ausente. Dado que la mayoría de pasos del ciclo de la urea son irreversibles, a menudo puede identificarse la actividad enzimática ausente mediante la determinación de qué intermediario del ciclo se encuentra a una concentración especialmente elevada en la sangre y/o en la orina. Aunque la degradación de aminoácidos puede tener consecuencias graves para la salud en individuos con deficiencias en el ciclo de la urea, la opción de una dieta carente de proteínas no es satisfactoria. Los seres humanos son incapaces de sintetizar la mitad de los 20 aminoácidos estándar, y estos **aminoácidos esenciales** (Tabla 18–1) se han de suministrar en la dieta.

A los pacientes con defectos en el ciclo de la urea se les aplican diversos tratamientos. La administración cuidadosa de los ácidos aromáticos benzoato o fenilbutirato en la dieta puede ayudar a reducir los niveles de amoníaco en la sangre. El benzoato se convierte en benzoil-CoA, que a su vez se combina con la glicina formando hipurato (**Fig. 18–14**, izquierda). La glicina utilizada en esta reacción debe ser regenerada, y así el amoníaco se utiliza en la reacción de la glicina sintasa. El fenilbutirato se convierte en fenilacetato por β-oxidación. El fenilacetato se convierte a continuación en fenilacetil-CoA, que se combina con glutamina para formar fenilacetilglutamina (Fig. 18–14, derecha). La eliminación consiguiente de glutamina desencadena su síntesis adicional por la glutamina sintasa (véase la Ec. 22-1) en una reacción que capta amoníaco. Tanto el hipurato como la

TABLA 18–1 Aminoácidos no esenciales y esenciales para los seres humanos y la rata albina

No esenciales	Condicionalmente esenciales*	Esenciales
Alanina	Arginina	Fenilalanina
Asparagina	Cisteína	Histidina
Aspartato	Glutamina	Isoleucina
Glutamato	Glicina	Leucina
Serina	Prolina	Lisina
	Tirosina	Metionina
		Treonina
		Triptófano
		Valina

*Esencial en animales jóvenes en crecimiento y/o durante una enfermedad.

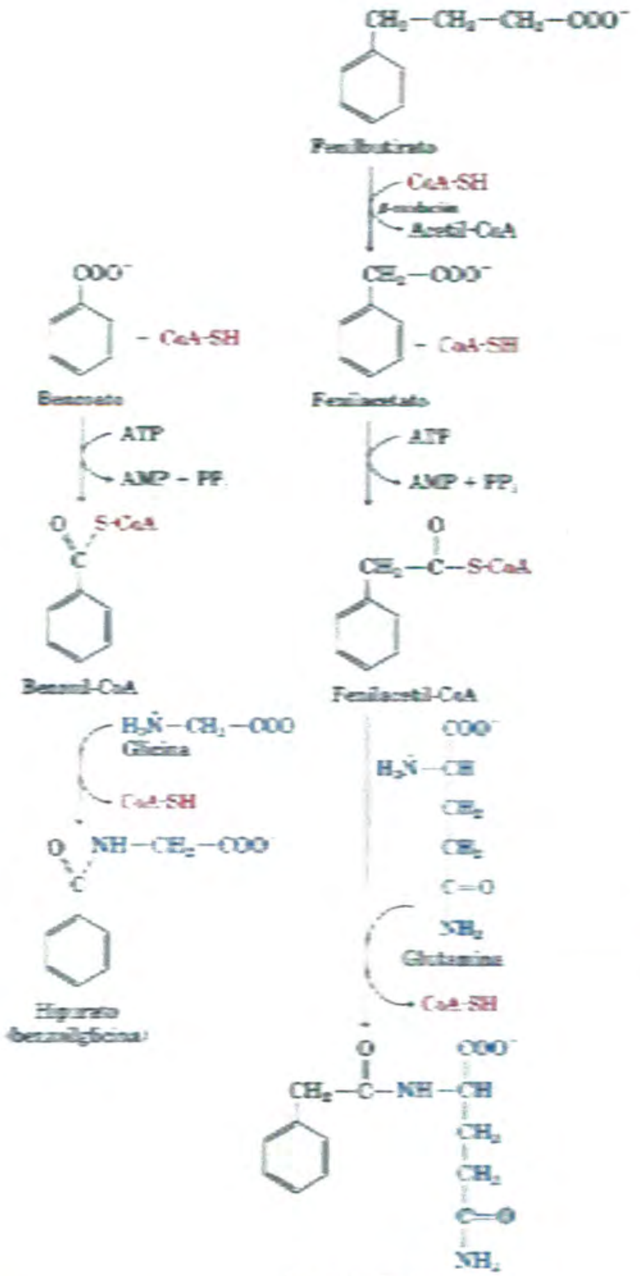
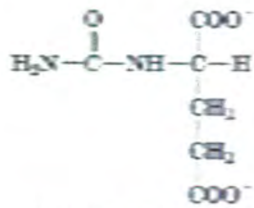


FIGURA 18–14 Tratamiento de carencias de enzimas del ciclo de la urea. Los ácidos aromáticos benzoato y fenilbutirato administrados en la dieta se metabolizan y combinan con glicina y glutamina, respectivamente, y los productos se excretan a través de la orina. La síntesis posterior de glicina y glutamina para reponer las reservas de estos intermediarios elimina amoníaco de la sangre.

fenilacetilglutamina son compuestos no tóxicos que se excretan a través de la orina. Aunque las rutas mostradas en la figura 18–14 solamente realizan contribuciones minoritarias al metabolismo normal, son ambas importantes cuando se ingieren ácidos aromáticos.

Otras terapias son más específicas de una determinada deficiencia enzimática. La deficiencia de *N*-acetilglutamato sintasa tiene como resultado la ausencia del activador normal de la carbamil fosfato sintetasa I (Fig. 18–13). Este estado puede tratarse administrando carbamil glutamato, un análogo del *N*-acetilglutamato que es efectivo como activador de la carbamil fosfato sintetasa I.



Carbamil glutamato

En el caso de las deficiencias en ornitina transcarbamilasa, argininosuccinato sintetasa y argininosuccinasa, puede ser muy útil suplementar la dieta mediante arginina. Muchos de estos tratamientos deben ir acompañados de un control estricto de la dieta, así como de suplementos de los aminoácidos esenciales. En los pocos casos existentes de deficiencia de arginasa, la arginina (es decir, el sustrato del enzima defectuoso) debe excluirse de la dieta. ■

RESUMEN 18.2 Excreción del nitrógeno y ciclo de la urea

- El amoníaco es muy tóxico para los tejidos animales. En el ciclo de la urea, la ornitina se combina con el amoníaco, en forma de carbamil fosfato, para formar citrulina. Un segundo grupo amino se transfiere a la citrulina desde el aspartato para formar la arginina, el precursor inmediato de la urea. La arginasa cataliza la hidrólisis de la arginina a urea y ornitina; de esta manera se regenera la ornitina en cada vuelta del ciclo.
- El ciclo de la urea tiene como resultado una conversión neta de oxalacetato en fumarato, ambos intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Los dos ciclos están, por tanto, interconectados.
- La actividad del ciclo de la urea está regulada al nivel de la síntesis de enzimas y por regulación alostérica del enzima que cataliza la formación de carbamil fosfato.

18.3 Rutas de degradación de los aminoácidos

Las rutas del catabolismo de los aminoácidos, consideradas en conjunto, normalmente sólo representan del 10 al 15% de la producción energética del cuerpo humano; estas rutas no son ni mucho menos tan activas como la glucólisis y la oxidación de los ácidos grasos. Además, el flujo a través de estas rutas varía mucho, dependiendo del equilibrio entre los requerimientos para procesos biosintéticos y la disponibilidad de un aminoácido determinado. Las 20 rutas catabólicas convergen para formar sólo seis productos principales, que entran todos ellos en el ci-

clo del ácido cítrico **(Fig. 18–15)**. De ahí los esqueletos carbonados se pueden desviar hacia la gluconeogénesis o la cetogénesis o se pueden oxidar completamente a CO_2 y H_2O.

Los esqueletos carbonados de siete de los aminoácidos se degradan, total o parcialmente, dando en último término acetil-CoA. Cinco aminoácidos se convierten en α-cetoglutarato, cuatro en succinil-CoA, dos en fumarato y dos en oxalacetato. Partes, o la totalidad, de seis aminoácidos se convierten en piruvato, que puede convertirse en acetil-CoA o en oxalacetato. Las rutas individuales de los 20 aminoácidos se resumen más adelante por medio de diagramas de flujo que conducen a un punto específico de entrada en el ciclo del ácido cítrico. En estos diagramas se muestran en color los átomos de carbono que entran en el ciclo del ácido cítrico. Observe que algunos aminoácidos aparecen más de una vez, lo que es reflejo del hecho que partes diferentes de sus esqueletos carbonados tienen destinos diferentes.

En lugar de examinar cada paso de cada ruta del catabolismo de los aminoácidos, se escogerán para una especial discusión algunas reacciones enzimáticas que son especialmente interesantes por sus mecanismos o por su significación médica.

Algunos aminoácidos se convierten en glucosa, otros en cuerpos cetónicos

Los siete aminoácidos que se degradan total o parcialmente a acetoacetil-CoA y/o acetil-CoA (fenilalanina, tirosina, isoleucina, leucina, triptófano, treonina y lisina) pueden dar cuerpos cetónicos en el hígado, en donde el acetoacetil-CoA se convierte en acetoacetato y a continuación en acetona y β-hidroxibutirato (véase la Fig. 17–18). Éstos son los aminoácidos **cetogénicos** (Fig. 18–15). Su capacidad para producir cuerpos cetónicos es evidente en la diabetes mellitus no controlada, en la que el hígado producen grandes cantidades de cuerpos cetónicos, tanto a partir de ácidos grasos como de los aminoácidos cetogénicos.

Los aminoácidos que son degradados a piruvato, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato y/o oxalacetato se pueden convertir en glucosa y glucógeno por las vías descritas en los Capítulo 14 y 15. Éstos son los aminoácidos **glucogénicos.** La división entre aminoácidos cetogénicos y glucogénicos no es absoluta; cinco aminoácidos (triptófano, fenilalanina, tirosina, treonina e isoleucina) son a la vez cetogénicos y glucogénicos. El catabolismo de los aminoácidos es especialmente crítico pa-

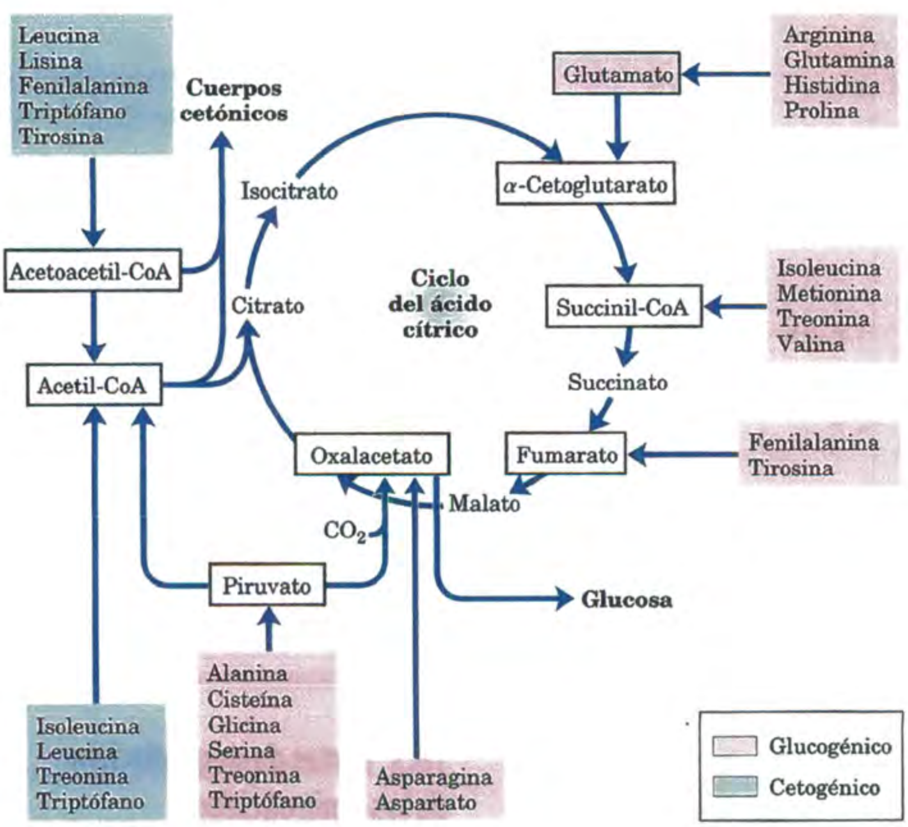
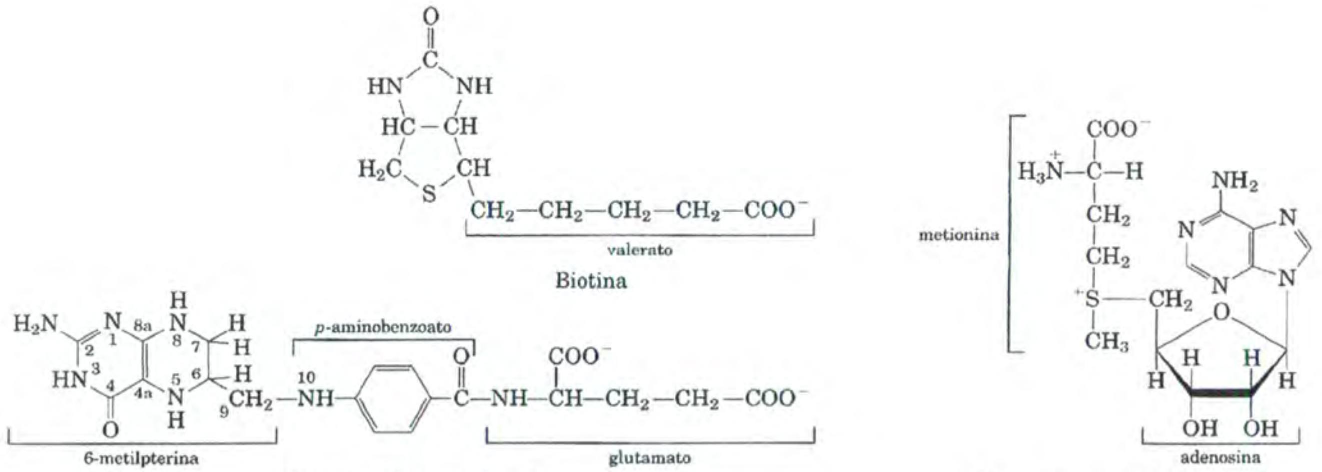


FIGURA 18–15 Resumen del catabolismo de los aminoácidos Los aminoácidos se agrupan según su producto de degradación principal. Algunos aminoácidos se mencionan más de una vez puesto que diferentes partes de su esqueleto carbonado se degradan a diferentes productos finales. La figura muestra las rutas catabólicas principales en animales vertebrados, si bien existen pequeñas variaciones entre especies de vertebrados. La treonina, por ejemplo, se degrada al menos a través de dos rutas diferentes (véanse las Figs. 18–19, 18–27) pudiendo variar la importancia de cada ruta en función del organismo y de las condiciones metabólicas. Los aminoácidos glucogénicos y cetogénicos también quedan delineados en la figura por el color del sombreado. Observe que hay cinco aminoácidos que son a la vez glucogénicos y cetogénicos. Los aminoácidos que se degradan a piruvato también son potencialmente cetogénicos. Sólo dos aminoácidos, leucina y lisina, son exclusivamente cetogénicos.



Tetrahidrofolato (H_4 folato) S-Adenosilmetionina (adoMet)

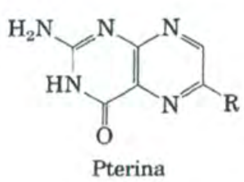
FIGURA 18–16 Algunos cofactores enzimáticos importantes en las reacciones de transferencia de grupos monocarbonados. Los átomos de nitrógeno a los que se unen los grupos monocarbonados en el tetrahidrofolato se muestran en azul.

ra la supervivencia de animales con dietas ricas en proteínas o durante la inanición. La leucina es un aminoácido exclusivamente cetogénico, que es muy abundante en las proteínas. Su degradación contribuye de manera sustancial a la cetosis en condiciones de inanición.

Varios cofactores enzimáticos juegan papeles importantes en el catabolismo de los aminoácidos

En las rutas catabólicas de los aminoácidos tienen lugar diversos reordenamientos químicos interesantes. Es útil iniciar el estudio de estas rutas observando las clases de reacciones que se repiten y presentando sus cofactores enzimáticos. Ya hemos considerado una clase importante: las reacciones de transaminación que requieren piridoxal fosfato. Otro tipo común de reacción en el catabolismo de los aminoácidos es la transferencia de grupos monocarbonados, en que interviene normalmente uno de los tres cofactores siguientes: biotina, tetrahidrofolato o *S*-adenosilmetionina **(Fig. 18–16)**. Estos cofactores transfieren grupos monocarbonados en diferentes estados de oxidación: la biotina transfiere carbono en su forma más oxidada, CO_2 (véase la Fig. 14-18); el tetrahidrofolato transfiere grupos monocarbonados en estados de oxidación intermedios y algunas veces como grupo metilo, y la *S*-adenosilmetionina transfiere grupos metilo, que constituyen el estado más reducido del carbono. Estos dos últimos cofactores son especialmente importantes en el metabolismo de los aminoácidos y nucleótidos.

El **tetrahidrofolato (H_4 folato),** sintetizado en bacterias, consta de una pterina sustituida (6-metilpterina), *p*-aminobenzoato y glutamato (Figura 18–16).



Pterina

La forma oxidada, el folato, es una vitamina para los mamíferos y se convierte mediante dos pasos en tetrahidrofolato por acción del enzima dihidrofolato reductasa. El grupo monocarbonado que experimenta la transferencia, en cualquiera de tres estados de oxidación, está unido al N-5, al N-10 o bien a ambos. La forma más reducida del cofactor es portadora de un grupo metilo, una forma más oxidada transporta un grupo metileno, mientras que las formas más oxidadas transportan un grupo metenilo, uno formilo o uno formimino **(Fig. 18–17)**. La mayoría de las formas del tetrahidrofolato son interconvertibles y actúan como dadores de unidades monocarbonadas en numerosas reacciones metabólicas. La fuente principal de unidades monocarbonadas en el caso del tetrahidrofolato es el carbono eliminado en la conversión de serina en glicina, obteniéndose N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato.

Aunque el tetrahidrofolato puede transportar un grupo metilo en el N-5, el potencial de transferencia de este grupo metilo es insuficiente para la mayoría de reacciones biosintéticas. La ***S*-adenosilmetionina (adoMet)** es el cofactor preferido para la transferencia biológica de grupos metilo. Se sintetiza a partir de ATP y metionina por acción de la **metionina adenosil transferasa (Fig. 18–18**, paso ①). Esta reacción es poco común ya que el átomo de azufre nucleofílico de la metionina ataca el carbono 5′ de la porción ribosa del ATP en lugar de atacar uno de los átomos de fósforo. Se libera trifosfato que se escinde a P_i y PP_i en el enzima; posteriormente, el PP_i es escindido por la pirofosfato inorgánico hidrolasa, de modo que en esta reacción se rompen tres enlaces, entre ellos dos de alta energía. La otra única reacción conocida en la que se desplaza trifosfato del ATP tiene lugar en la síntesis del coenzima B_{12} (véase el Recuadro 17–2, Fig. 3).

La *S*-adenosilmetionina es un potente agente alquilante debido a su ión sulfonio desestabilizante. El grupo metilo se encuentra sujeto al ataque de nucleófilos y es aproximadamente 1.000 veces más reactivo que el grupo metilo del N^5-metiltetrahidrofolato.

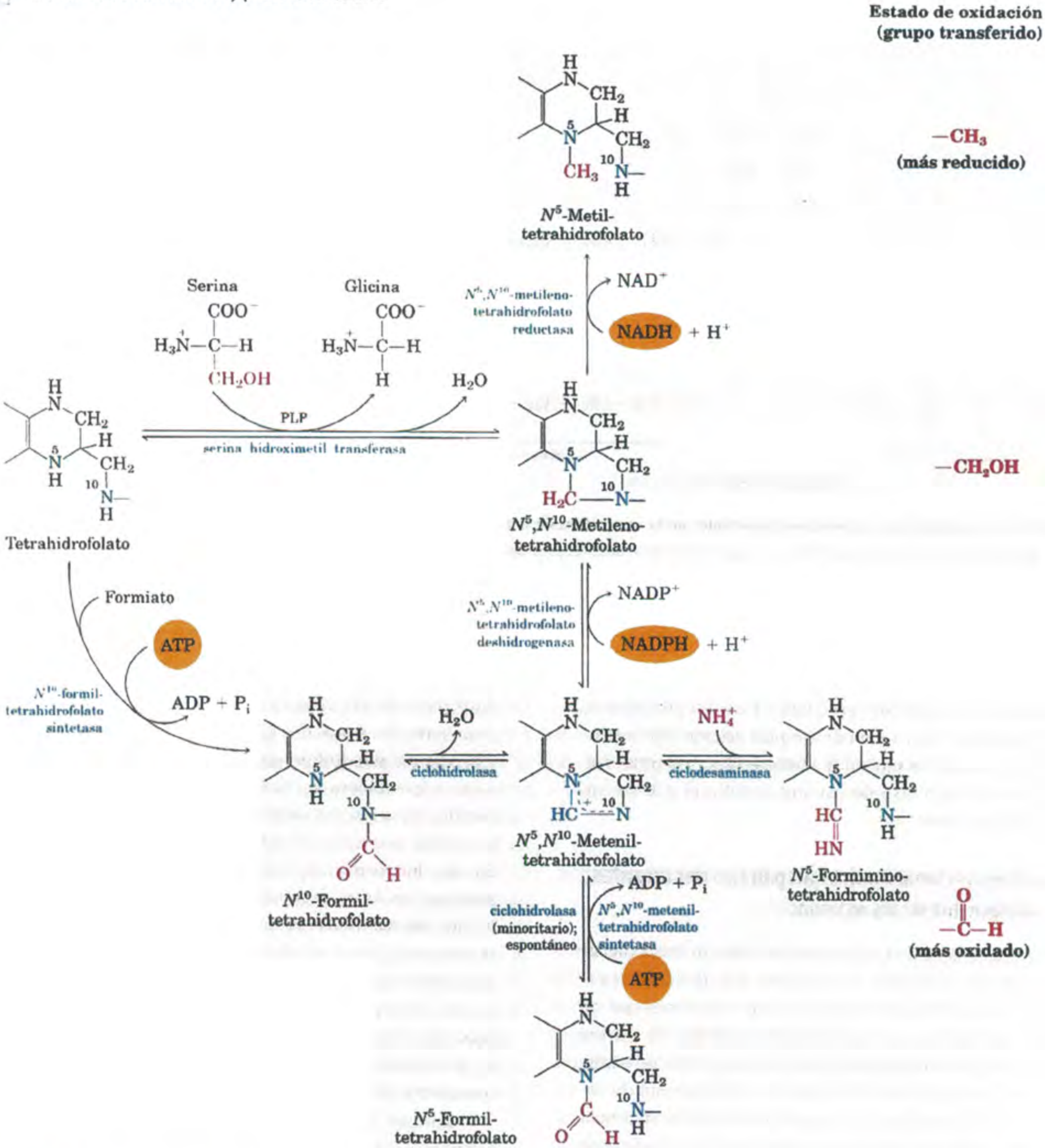


FIGURA 18–17 Conversiones de unidades monocarbonadas en el tetrahidrofolato. Las diferentes especies moleculares se agrupan según sus estados de oxidación, con la más reducida en la parte superior y la más oxidada en la parte inferior. Todas las especies incluidas dentro de un recuadro sombreado tienen el mismo estado de oxidación. La conversión de N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato a N^5-metiltetrahidrofolato es totalmente irreversible. La transferencia enzimática de grupos formilo, tal como tiene lugar en la síntesis de purinas (véase la Fig. 22–33) y en la formación de formilmetionina en bacterias (Capítulo 27) utiliza generalmente N^{10}-formiltetrahidrofolato en lugar de N^5-formiltetrahidrofolato. La segunda forma es significativamente más estable, y por tanto un dador más débil de grupos formilo. El N^5-formiltetrahidrofolato es un producto secundario minoritario de la reacción de la ciclohidrolasa y, además, también puede formarse de manera espontánea. La conversión de N^5-formitetrahidrofolato en N^5,N^{10}-meteniltetrahidrofolato requiere ATP debido a su equilibrio que, de otro modo, sería desfavorable. Observe que el N^5-formiminotetrahidrofolato proviene de la histidina según una ruta mostrada en la Fig. 18–26.

La transferencia del grupo metilo desde la S-adenosilmetionina a un aceptor produce la ***S*-adenosilhomocisteína** (Fig. 18–18, paso ②), que a continuación se rompe, dando homocisteína y adenosina (paso ③). La metionina se regenera por transferencia de un grupo metilo a la homocisteína en una reacción catalizada por la metionina sintasa (paso ④), y la metionina se reconvierte en *S*-adenosilmetionina para completar un ciclo del metilo activado.

Una forma de la metionina sintasa frecuente en bacterias utiliza N^5-metiltetrahidrofolato como dador de metilo. Otra forma del enzima presente en algunas bacterias y mamíferos utiliza N^5-metiltetrahidrofolato pero el grupo metilo se transfiere primero a la cobalamina, procedente del coenzima B_{12}, y se forma metilcobalamina, que es el dador de metilo en la formación de metionina. Esta reacción y el reordenamiento del L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA (véase el Recuadro 17–2, Fig. 1a) son

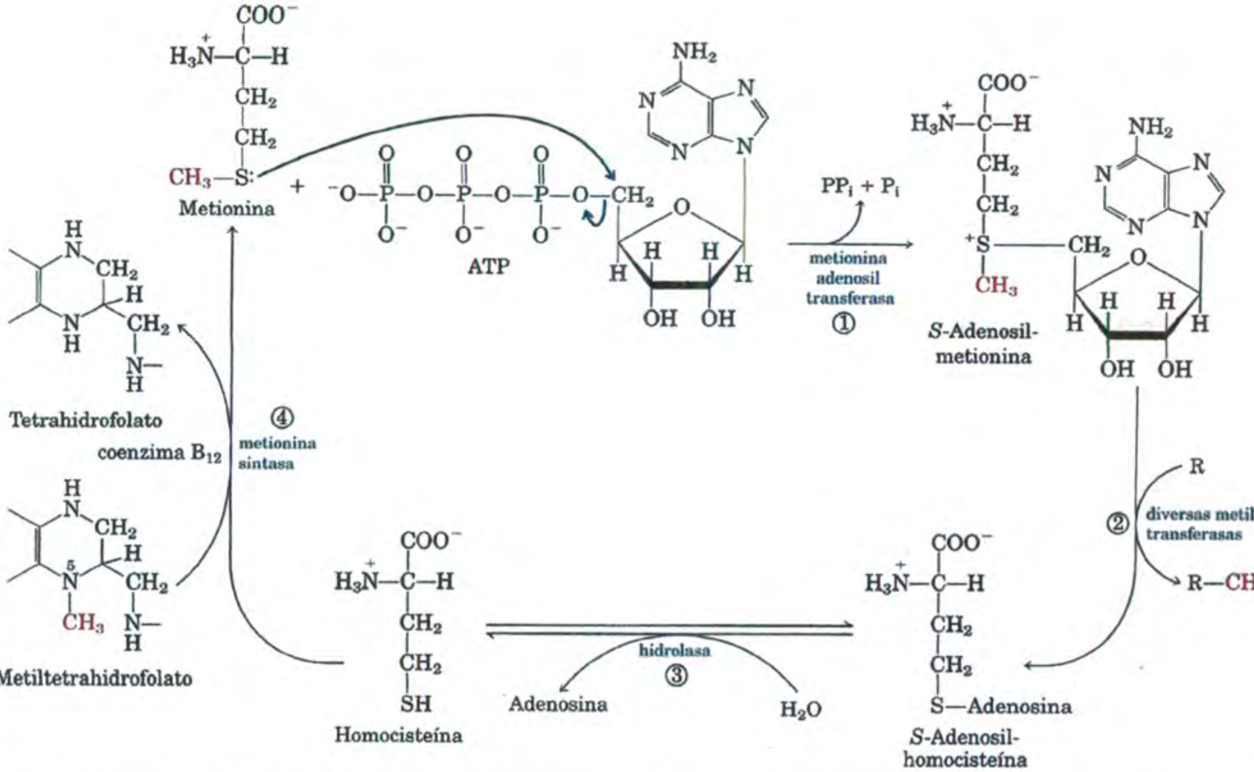


FIGURA 18–18 Síntesis de metionina y de *S*-adenosilmetionina en un ciclo del metilo activado. Los pasos se describen en el texto. En la reacción de la metionina sintasa (paso ④) el grupo metilo se transfiere a la cobalamina formando metilcobalamina que, a su vez, es el dador de metilo en la formación de metionina. La *S*-adenosilmetionina, que tiene un azufre cargado positivamente (siendo por tanto un ión sulfonio), es un agente metilante potente en diversas reacciones biosintéticas. El aceptor de grupo metilo (paso ②) se designa como R.

las únicas reacciones dependientes de coenzima B_{12} que se conocen en los mamíferos.

Las vitaminas B_{12} y folato están muy relacionadas en estas rutas metabólicas. La enfemedad por carencia de B_{12}, la **anemia perniciosa,** es rara y sólo se observa en individuos que tienen un defecto en las rutas de absorción intestinal de esta viamina (véase el Recuadro 17–2) o en vegetarianos estrictos (la B_{12} no se encuentra en las plantas). Esta enfermedad progresa lentamente, ya que sólo se requieren pequeñas cantidades de vitamina B_{12} y los depósitos de B_{12} en el hígado pueden durar de tres a cinco años. Los síntomas no sólo incluyen la anemia sino también diversos transtornos neurológicos.

La anemia puede atribuirse a la reacción de la metionina sintasa. Tal como se ha dicho, el grupo metilo de la metilcobalamina proviene del N^5-metiltetrahidrofolato, siendo ésta la única reacción en los mamíferos que utiliza el N^5-metiltetrahidrofolato. Dado que la reacción que convierte la forma N^5,N^{10}-metileno en la forma N^5-metilo del tetrahidrofolato es irreversible (Fig. 18–17), si el coenzima B_{12} no está disponible para la síntesis de metilcobalamina, entonces los folatos metabólicos quedan atrapados en la forma N^5-metilo. La anemia asociada con la carencia de vitamina B_{12} se denomina **anemia megaloblástica.** Se manifiesta con una disminución en la producción de eritrocitos maduros (glóbulos rojos de la sangre) y la aparición en la médula ósea de células precursoras inmaduras o **megaloblastos.** Los eritrocitos son reemplazados gradualmente en la sangre por cantidades menores de eritrocitos más grandes denominados **macrocitos.** El defecto en el desarrollo de los eritrocitos es una consecuencia directa de la desaparición del N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato, que es necesario para la síntesis de nucleótidos de timidina requeridos en la síntesis de DNA (véase el Capítulo 22). La carencia de folato, en la que han desaparecido todas las formas de tetrahidrofolato, también produce anemia debido básicamente a las mismas razones. Los síntomas de anemia en la carencia de vitamina B_{12} pueden aliviarse administrado vitamina B_{12} o folato.

No obstante, es peligroso tratar la anemia perniciosa solamente con suplementos de folato, ya que continuarán progresando los síntomas neurológicos de la carencia de B_{12}. Estos síntomas no proceden del defecto en la reacción de la metionina sintasa, sino que la metilmalonil-CoA mutasa defectuosa produce un acumulación de ácidos grasos de cadena impar en las membranas neuronales. La anemia asociada con la carencia de folato se trata a menudo administrando tanto folato como vitamina B_{12}, al menos hasta que se haya determinado sin ambigüedad la causa metabólica de la anemia. El diagnóstico precoz de la carencia de B_{12} es importante porque algunos de los trastornos neurológicos pueden ser irreversibles.

La carencia de folato también disminuye la disponibilidad del N^5-metiltetrahidrofolato necesario para la función de la metionina sintasa. Esto lleva a un incremento de la concentración de homocisteína en sangre, situación asociada con enfermedades cardíacas, hipertensión y embolia. Los niveles elevados de homocisteína pueden ser responsables del 10% de todos los ca-

sos de enfermedad cardíaca. La enfermedad se trata con suplementos de folato. ■

La **tetrahidrobiopterina,** otro cofactor del catabolismo de aminoácidos, es similar a la porción pterina del tetrahidrofolato, pero no interviene en la transferencia de grupos monocarbonados; en lugar de ello, participa en reacciones de oxidación. Consideraremos su modo de acción cuando expliquemos la degradación de la fenilalanina (véase la Fig. 18–24).

Seis aminoácidos se degradan a piruvato

Los esqueletos carbonados de seis aminoácidos se convierten, total o parcialmente, en piruvato. El piruvato puede convertirse a continuación en acetil-CoA y en último término oxidado vía ciclo del ácido cítrico, o en oxalacetato y desviado a la gluconeogénesis. Los seis aminoácidos son alanina, triptófano, cisteína, serina, glicina y treonina **(Fig. 18–19)**. La **alanina** da piruvato directamente al transaminarse con α-cetoglutarato y la cadena lateral del **triptófano** se corta, para dar alanina y, por tanto, piruvato. La **cisteína** se convierte en piruvato en dos pasos; uno elimina el átomo de azufre y el otro es una transaminación. La **serina** se convierte en piruvato por acción de la serina deshidratasa. Tanto los grupos α-hidroxilo como α-amino de la serina se eliminan en esta única reacción dependiente de piridoxal fosfato **(Fig. 18–20a)**.

La **glicina** se degrada mediante tres rutas, de las que sólo una lleva a piruvato. La glicina se convierte en serina mediante la adición enzimática de un grupo hidroximetilo (Figs. 18–19 y 18–20b). Esta reacción, catalizada por la **serina hidroximetil transferasa,** requiere los coenzimas tetrahidrofolato y piridoxal fosfato. La serina se convierte en piruvato según se ha descrito anteriormente. En la segunda ruta, predominante en animales, la glicina se rompe de forma oxidativa en CO_2, NH_4^+ y un grupo metileno (—CH_2—) (Figs. 18–19, 18–20c). Esta reacción fácilmente reversible, catalizada por el **enzima de rotura de la glicina** (también llamado glicina sintasa), también requiere tetrahidrofolato, que acepta el grupo metileno. En esta ruta de rotura oxidativa los dos átomos de carbono de la glicina no entran en el ciclo del ácido cítrico. Un carbono se pierde en forma de CO_2 y el otro se convierte en el grupo metileno del N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato (Fig. 18–17), dador de un grupo monocarbonado en ciertas rutas biosintéticas.

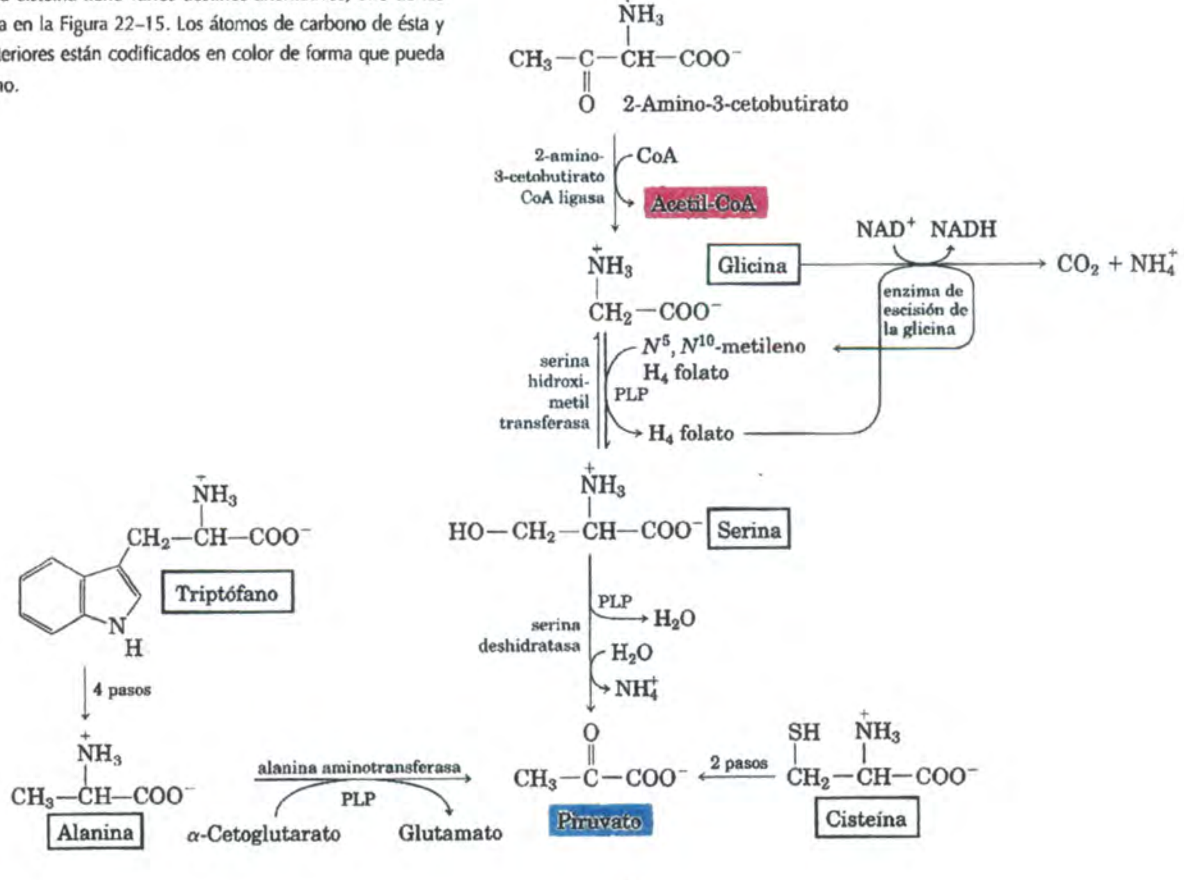


FIGURA 18–19 Rutas catabólicas de la alanina, glicina, serina, cisteína, triptófano y treonina. En la Fig. 18–21 se muestra el destino del grupo indol del triptófano. En la Fig. 18–20 se muestran detalles de la mayor parte de las reacciones en las que intervienen serina y glicina. La ruta de degradación de la treonina que se muestra aquí sólo explica una tercera parte del catabolismo de la treonina (para la ruta alternativa, véase la Fig. 18–27). Varias rutas de degradación de la cisteína conducen a piruvato. El azufre de la cisteína tiene varios destinos alternativos, uno de los cuales se muestra en la Figura 22–15. Los átomos de carbono de ésta y otras figuras posteriores están codificados en color de forma que pueda seguirse su destino.

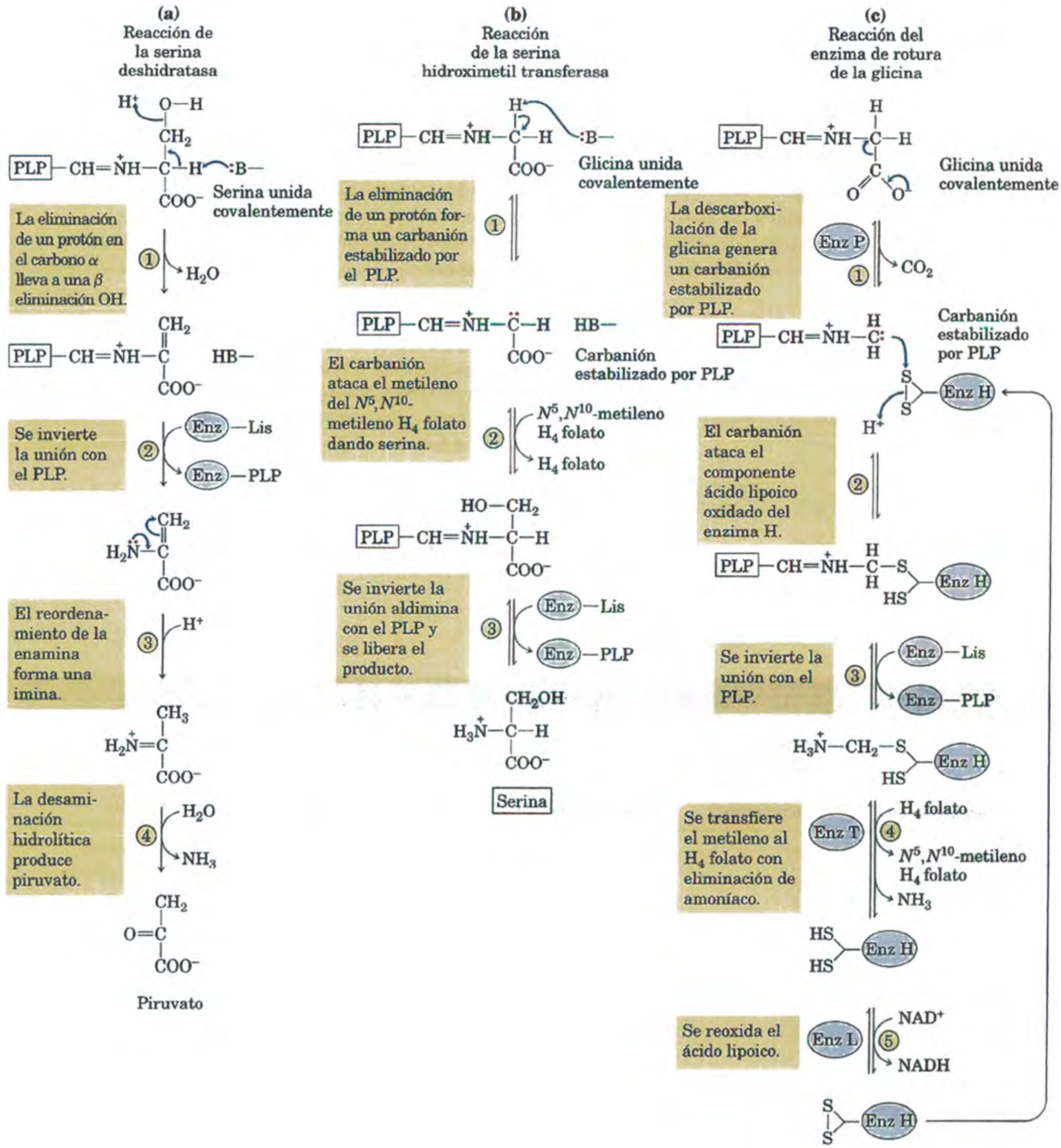
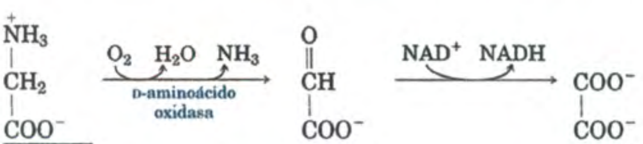


FIGURA DE MECANISMO 18–20 Influencia recíproca de los cofactores piridoxal fosfato y tetrahidrofolato en el metabolismo de la serina y glicina. En el primer paso de cada una de estas reacciones (no mostrado) interviene la formación de una unión imina covalente entre el PLP unido al enzima y el aminoácido sustrato, serina en **(a)** y glicina en **(b)** y **(c)**. **(a)** Una eliminación de agua catalizada por PLP en la reacción de la serina deshidratasa (paso ①), inicia la ruta hacia el piruvato. **(b)** En la reacción de la serina hidroximetiltransferasa, un carbanión estabilizado por PLP (producto del paso ①) es un intermedio clave en la transferencia del grupo metileno (en forma de —CH_2—OH) desde el N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato para formar serina. **(c)** El enzima de rotura de la glicina es un complejo multienzimático que contiene los componentes P, H, T y L. La reacción global, que es reversible, convierte la glicina en CO_2 y NH_4^+, mientras que el segundo carbono de la glicina es captado por el tetrahidrofolato en forma de N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato. El piridoxal fosfato activa el carbono α de los aminoácidos en momentos críticos en todas estas reacciones, mientras que el tetrahidrofolato es portador de unidades monocarbonadas en dos de ellas (véanse las Figs. 18-6 y 18-17).

Esta segunda ruta de degradación de la glicina parece ser crítica en los mamíferos. Los humanos con defectos graves en la actividad del enzima de rotura de la glicina sufren una enfermedad denominada hiperglicinemia no cetótica. Esta enfermedad se caracteriza por concentraciones elevadas de glicina en el suero que conducen a deficiencias mentales graves y a la muerte en la niñez muy temprana. A niveles elevados, la glicina es un neurotransmisor inhibidor, lo que quizá explique los efectos neurológicos de la enfermedad. En el ser humano se han identificado muchos defectos genéticos del metabolismo de los aminoácidos (Tabla 18–2). Encontraremos otros a lo largo de este capítulo. ■

En la tercera y última vía de la degradación de la glicina, la molécula aquiral de glicina es sustrato del enzima D-aminoácido oxidasa. La glicina se convierte en glioxilato, un sustrato alternativo de la lactato deshidrogenada hepática (p. 547). El glioxilato se oxida a oxalato en una reacción dependiente de NAD^+:



Glicina — Glioxilato — Oxalato

Se cree que la función primaria de la D-aminoácido oxidasa, presente a concentraciones elevadas en el riñón, es la destoxificación de D-aminoácidos ingeridos procedentes de las paredes celulares bacterianas y de alimentos cocinados (el calor elevado produce la racemización espontánea de los L-aminoácidos de las proteínas). El oxalato, ya sea obtenido de los alimentos o producido enzimáticamente en los riñones, tiene significación médica. Los cristales de oxalato cálcico son la causa de hasta el 75% de los cálculos renales. ■

Existen dos rutas significativas para la degradación de la **treonina.** Una primera ruta conduce a piruvato vía glicina (Fig. 18–19). La conversión en glicina tiene lugar en dos pasos, en los que la treonina se convierte primero en 2-amino-3-cetobutirato por acción de la treonina deshidrogenasa. Ésta es una ruta relativamente minoritaria en los seres humanos, que da cuenta del 10% al 30% del catabolismo de la treonina, pero que es bastante más importante en otros mamíferos. La ruta principal en humanos conduce al succinil-CoA, tal como se describe más adelante.

En el laboratorio la serina hidroximetil transferasa cataliza la conversión de treonina en glicina y acetaldehído en un paso, pero ésta no es una ruta significativa de degradación de la treonina en mamíferos.

TABLA 18–2 Algunas enfermedades genéticas humanas que afectan el catabolismo de aminoácidos

Trastorno médico	Incidencia aproximada (por 100.000 nacimientos)	Proceso defectuoso	Enzima defectuoso	Síntomas y efectos
Albinismo	<3	Síntesis de melanina a partir de tirosina	Tirosina 3-monooxigenasa (tirosinasa)	Falta de pigmentación: cabello blanco, piel rosada
Alcaptonuria	<0,4	Degradación de tirosina	Homogentisato 1,2-dioxigenasa	Pigmento oscuro en la orina; desarrollo posterior de artritis
Argininemia	<0,5	Síntesis de urea	Arginasa	Retraso mental
Acidemia argininosuccínica	<1,5	Síntesis de urea	Argininosuccinasa	Vómito, convulsiones
Deficiencia de carbamil fosfato sintetasa I	<0,5	Síntesis de urea	Carbamil fosfato sintetasa I	Letargia; convulsiones; muerte temprana
Homocistinuria	<0,5	Degradación de metionina	Cistationina β-sintasa	Desarrollo óseo incorrecto; retraso mental
Enfermedad del jarabe de arce en la orina (cetoaciduria de cadena ramificada)	<0,4	Degradación de isoleucina, leucina y valina	Complejo de α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	Vómitos; convulsiones; retraso mental; muerte temprana
Acidemia metilmalónica	<0,5	Conversión de propionil-CoA en succinil-CoA	Metilmalonil-CoA mutasa	Vómitos; convulsiones; retraso mental; muerte temprana
Fenilcetonuria	<8	Conversión de fenilalanina en tirosina	Fenilalanina hidroxilasa	Vómito neonatal; retraso mental

Siete aminoácidos se degradan a acetil-CoA

Porciones del esqueleto carbonado de siete aminoácidos (**triptófano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina** y **treonina**) producen acetil-CoA y/o acetoacetil-CoA; el segundo se convierte seguidamente en acetil-CoA **(Fig. 18–21)**. Algunos de los pasos finales de las rutas degradativas de leucina, lisina y triptófano son semejantes a determinados pasos en la degradación de ácidos grasos. La treonina (no mostrada en la Fig. 18-21) produce algo de acetil-CoA a través de la ruta minoritaria ilustrada en la Figura 18–19.

Las rutas degradativas de dos de estos siete aminoácidos merecen mención especial. La degradación del triptófano constituye la ruta más compleja de todas las vías del catabolismo de aminoácidos en tejidos animales; partes del triptófano (cuatro de sus carbonos) producen acetil-CoA vía acetoacetil-CoA. Algunos de los intermediarios del catabolismo del triptófano son precursores para la síntesis de otras biomoléculas **(Fig. 18–22)**, entre ellas el nicotinato, que es un precursor del NAD y del NADP en animales; la serotonina, un neurotransmisor en los vertebrados, y el indolacetato, un factor de crecimiento en plantas. Algunas de estas rutas biosintéticas se describen más detalladamente en el Capítulo 22 (véanse las Figs. 22-28, 22-29).

La degradación de la fenilalanina es digna de mención dado que defectos genéticos en los enzimas de esta ruta conducen a

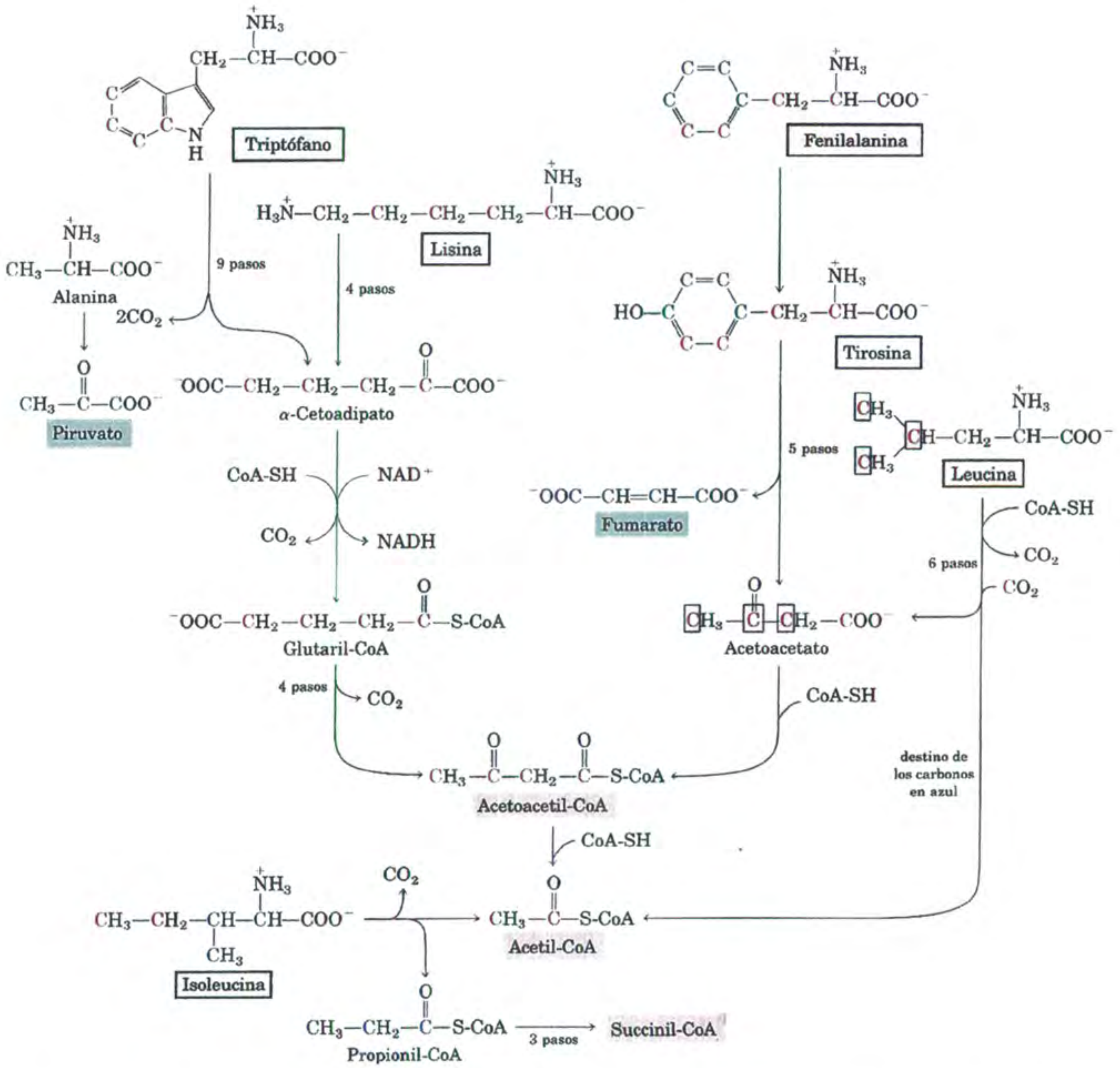


FIGURA 18–21 Rutas catabólicas de triptófano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina. Estos aminoácidos ceden algunos de sus átomos de carbono (en rojo) al acetil-CoA. El triptófano, la fenilalanina, la tirosina y la isoleucina también aportan carbonos (en azul) al piruvato o a intermediarios del ciclo del ácido cítrico. La ruta de la fenilalanina se describe con mayor detalle en la Fig. 18–23. En este esquema no se muestra el destino de los átomos de nitrógeno; en la mayoría de los casos se transfieren al α-cetoglutarato, formando glutamato.

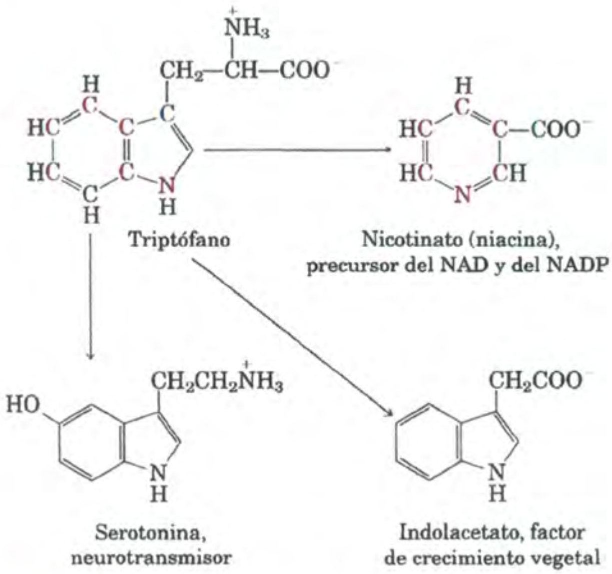


FIGURA 18–22 El triptófano como precursor. Los anillos aromáticos del triptófano dan lugar a nicotinato (niacina), indolacetato y serotonina. Se utilizan átomos coloreados para seguir el origen de los átomos del anillo en el nicotinato.

diversas enfermedades hereditarias humanas (**Fig. 18–23**), tal como se discute más adelante. La fenilalanina y su producto de oxidación tirosina (ambas de nueve carbonos) se degradan, dando dos fragmentos que pueden entrar en el ciclo del ácido cítrico: cuatro de los nueve átomos de carbono producen acetoacetato libre, que se convierte en acetoacetil-CoA y por tanto en acetil-CoA, y un segundo fragmento de cuatro carbonos se recupera en forma de fumarato. De este modo, ocho de los nueve átomos de carbono de estos dos aminoácidos entran en el ciclo del ácido cítrico; el carbono restante se pierde en forma de CO_2. Después de su hidroxilación a tirosina, la fenilalanina es también el precursor de la dopamina, un neurotransmisor, y de la noradrenalina y adrenalina, hormonas secretadas por la médula adrenal (véase la Fig. 22–29). La melanina, que es el pigmento negro de la piel y del pelo, procede también de la tirosina.

En algunas personas el catabolismo de la fenilalanina es genéticamente defectuoso

Dado que muchos aminoácidos son neurotransmisores, o precursores o antagonistas de neurotransmisores, defectos genéticos del metabolismo de los aminoácidos pueden

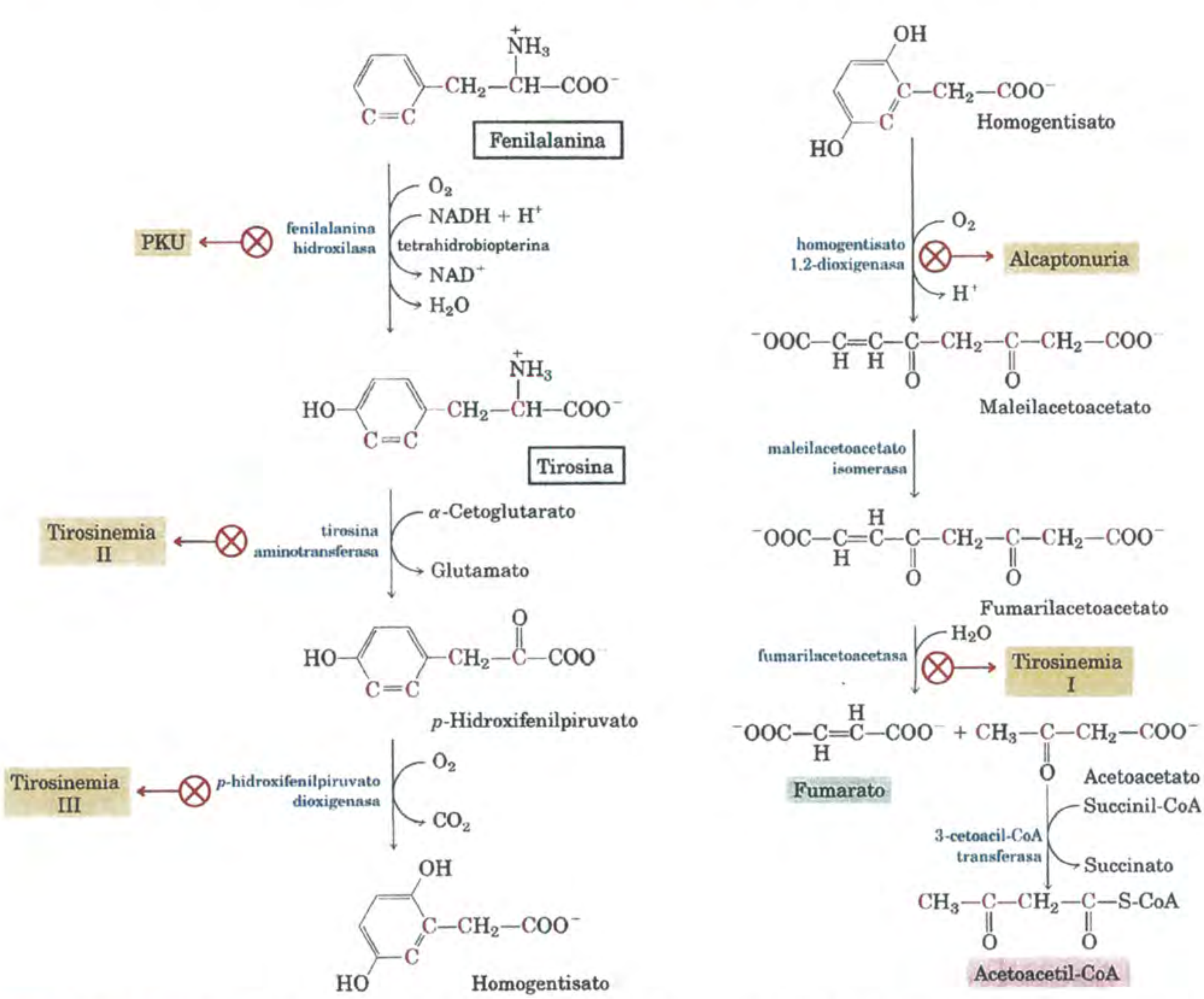


FIGURA 18–23 Rutas catabólicas de la fenilalanina y tirosina. Estos aminoácidos se convierten normalmente en acetoacetil-CoA y fumarato en los seres humanos. Se sabe que defectos genéticos en muchos de estos enzimas producen enfermedades congénitas humanas (sombreadas en amarillo).

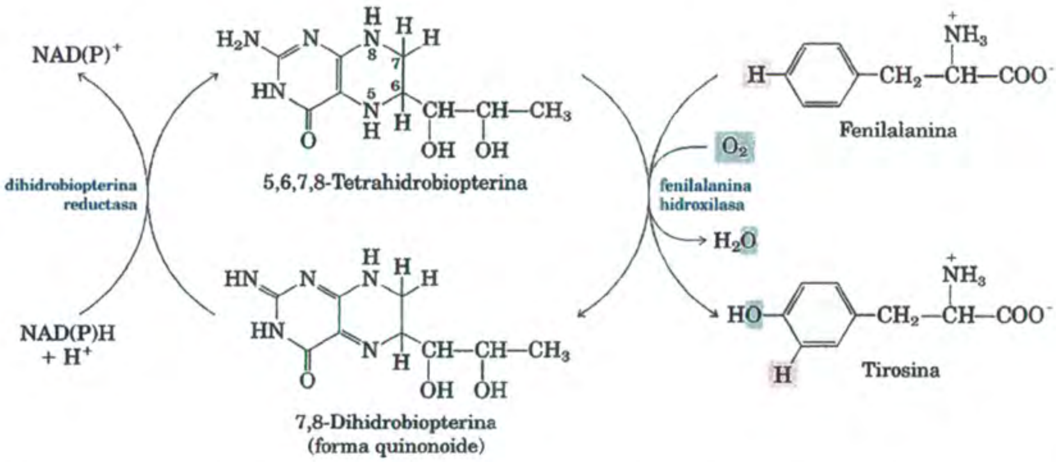


FIGURA 18–24 Función de la tetrahidrobiopterina en la reacción de la fenilalanina hidroxilasa. El átomo de H sombreado en rosa se transfiere directamente desde el C-4 al C-3 en la reacción. Esta característica, descubierta en los National Institutes of Health, se conoce como "desplazamiento NIH".

producir un desarrollo neuronal defectuoso y retraso mental. En la mayoría de tales enfermedades se acumulan intermediarios específicos. Por ejemplo, un defecto genético de la **fenilalanina hidroxilasa,** el primer enzima de la ruta catabólica de la fenilalanina (Fig. 18–23), es responsable de la enfermedad **fenilcetonuria (PKU),** la causa más frecuente de la presencia de niveles elevados de fenilalanina (hiperfenilalaninemia).

La fenilalanina hidroxilasa (denominada también fenilalanina-4-monooxigenasa) pertenece a una clase general de enzimas denominados **oxidasas de función mixta** (véase el Recuadro 21–1), que catalizan la hidroxilación simultánea de un sustrato por un átomo de oxígeno del O_2, y la reducción del otro átomo de oxígeno a H_2O. La fenilalanina hidroxilasa requiere el cofactor tetrahidrobiopterina, que transporta electrones desde el NADH al O_2, oxidándose a dihidrobiopterina en el proceso **(Fig. 18–24)**. Seguidamente es reducida por el enzima **dihidrobiopterina reductasa,** en una reacción que requiere NADPH.

En individuos con PKU, entra en juego una ruta secundaria del metabolismo de la fenilalanina, que normalmente se utiliza muy poco, en la que la fenilalanina se transamina con el piruvato, dando **fenilpiruvato (Fig. 18–25)**. La fenilalanina y el fenilpiruvato se acumulan en la sangre y los tejidos y se excretan en la orina: de ahí el nombre de la enfermedad, "fenilcetonuria". Gran parte del fenilpiruvato en vez de excretarse como tal, se descarboxila produciendo fenilacetato o se reduce formando fenil-lactato. El fenilacetato confiere un olor característico a la orina, que ha sido utilizado tradicionalmente por las enfermeras para detectar la PKU en lactantes. La acumulación de fenilalanina o sus metabolitos en las primeras etapas de la vida perjudica el desarrollo normal del cerebro, provocando retraso mental grave. La causa puede ser que el exceso de fenilalanina compita con otros aminoácidos en el transporte a través de la barrera hematoencefálica, causando un déficit de metabolitos imprescindibles.

La fenilcetonuria fue uno de los primeros defectos genéticos humanos que se descubrieron. Cuando se detecta esta enfermedad de forma precoz, se puede prevenir en gran parte el retraso mental mediante un control dietético rígido. La dieta ha de suministrar sólo la fenilalanina y la tirosina suficientes para cubrir las necesidades de la síntesis proteica. Se ha de restringir el consumo de alimentos ricos en proteína. Las proteínas naturales, tales como la caseína de la leche, se han de hidrolizar previamente y eliminar la mayor parte de la fenilalanina para proporcionar una dieta adecuada, al menos durante la infancia. Dado que el edulcorante artificial aspartame es un dipéptido de aspartato y del éster metílico de la fenilalanina (véase la Fig. 1–23b), los alimentos edulcorados con aspartame llevan advertencias para las personas con dietas controladas en fenilalanina.

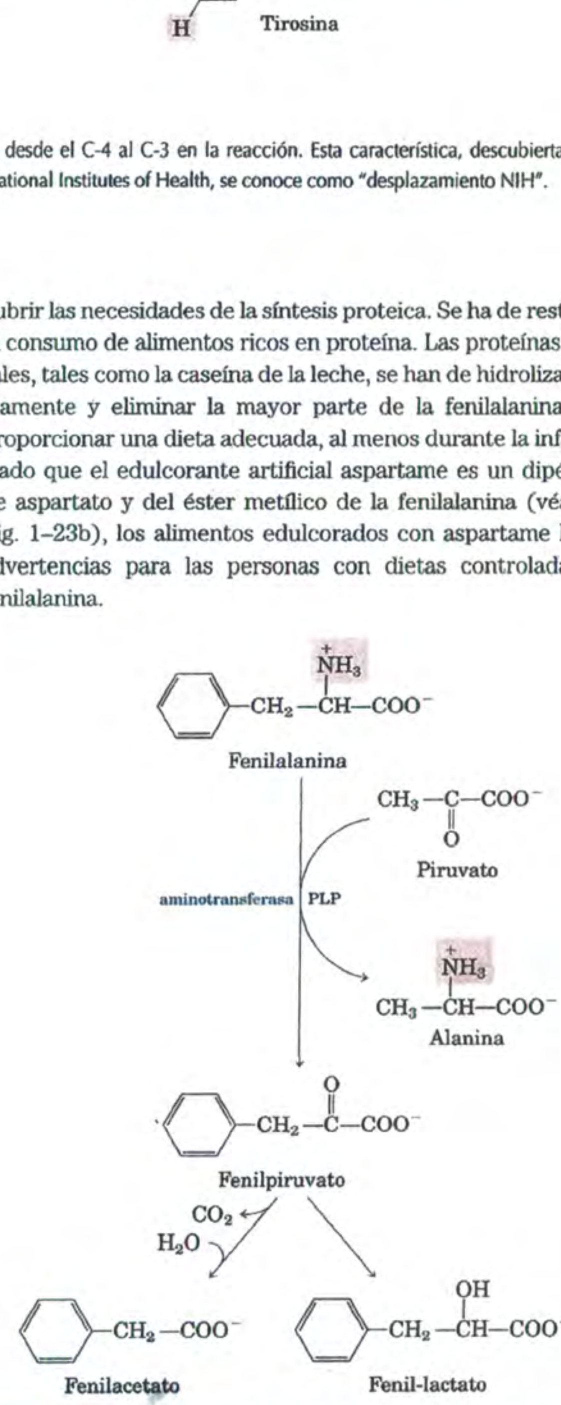


FIGURA 18–25 Rutas alternativas para el catabolismo de la fenilalanina en la fenilcetonuria. En la PKU, el fenilpiruvato se acumula en los tejidos, la sangre y la orina. El fenilacetato y el fenil-lactato se pueden encontrar también en la orina.

La fenilcetonuria también puede ser provocada por un defecto en el enzima que cataliza la regeneración de la tetrahidrobiopterina (Fig. 18–24). El tratamiento en este caso es más complejo que restringir la ingestión de fenilalanina y tirosina. La tetrahidrobiopterina es también necesaria para la formación de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) y 5-hidroxitriptófano, precursores de los neurotransmisores noradrenalina y serotonina, respectivamente, por lo que en una fenilcetonuria de este tipo estos precursores deben ser suministrados con la dieta. El suplemento de tetrahidrobiopterina con la dieta no es efectivo porque es inestable y no cruza la barrera hematoencefálica.

El rastreo de enfermedades genéticas en los recién nacidos puede ser muy rentable, especialmente en el caso de la PKU. Las pruebas (que ya no se basan en el olor de la orina) son relativamente baratas y la detección y el tratamiento temprano de la PKU en los lactantes (ocho a diez casos por cada 100.000 nacimientos) ahorra millones de dólares cada año en gastos sanitarios posteriores. Más importante todavía, el trauma emocional humano que se evita con estas pruebas sencillas es incalculable.

Otro defecto hereditario del catabolismo de la fenilalanina es la **alcaptonuria,** en la que el enzima defectuoso es la **homogentisato dioxigenasa** (Fig. 18–23). Esta enfermedad, menos grave que la PKU, produce pocos efectos nocivos, aunque se excretan grandes cantidades de homogentisato y su oxidación hace que la orina se vuelva negra. Los individuos con alcaptonuria son también propensos a desarrollar una forma de artritis. La alcaptonuria tiene un considerable interés histórico. Hacia el año 1900, Archibald Garrod descubrió que esta enfermedad es hereditaria, y consiguió establacer que se debía a la ausencia de un único enzima. Garrod fue el primero en establacer una conexión entre un defecto hereditario y un enzima, lo que constituyó un avance importante en la ruta que condujo finalmente a nuestro conocimiento actual sobre los genes y las rutas de la información descritas en la Parte III. ■

Cinco aminoácidos se convierten en α-cetoglutarato

Los esqueletos carbonados de cinco aminoácidos (prolina, glutamato, glutamina, arginina e histidina) entran en el ciclo del ácido cítrico en forma de α-cetoglutarato **(Fig. 18–26)**. La **prolina,** el **glutamato** y la **glutamina** tienen esqueletos pentacar-

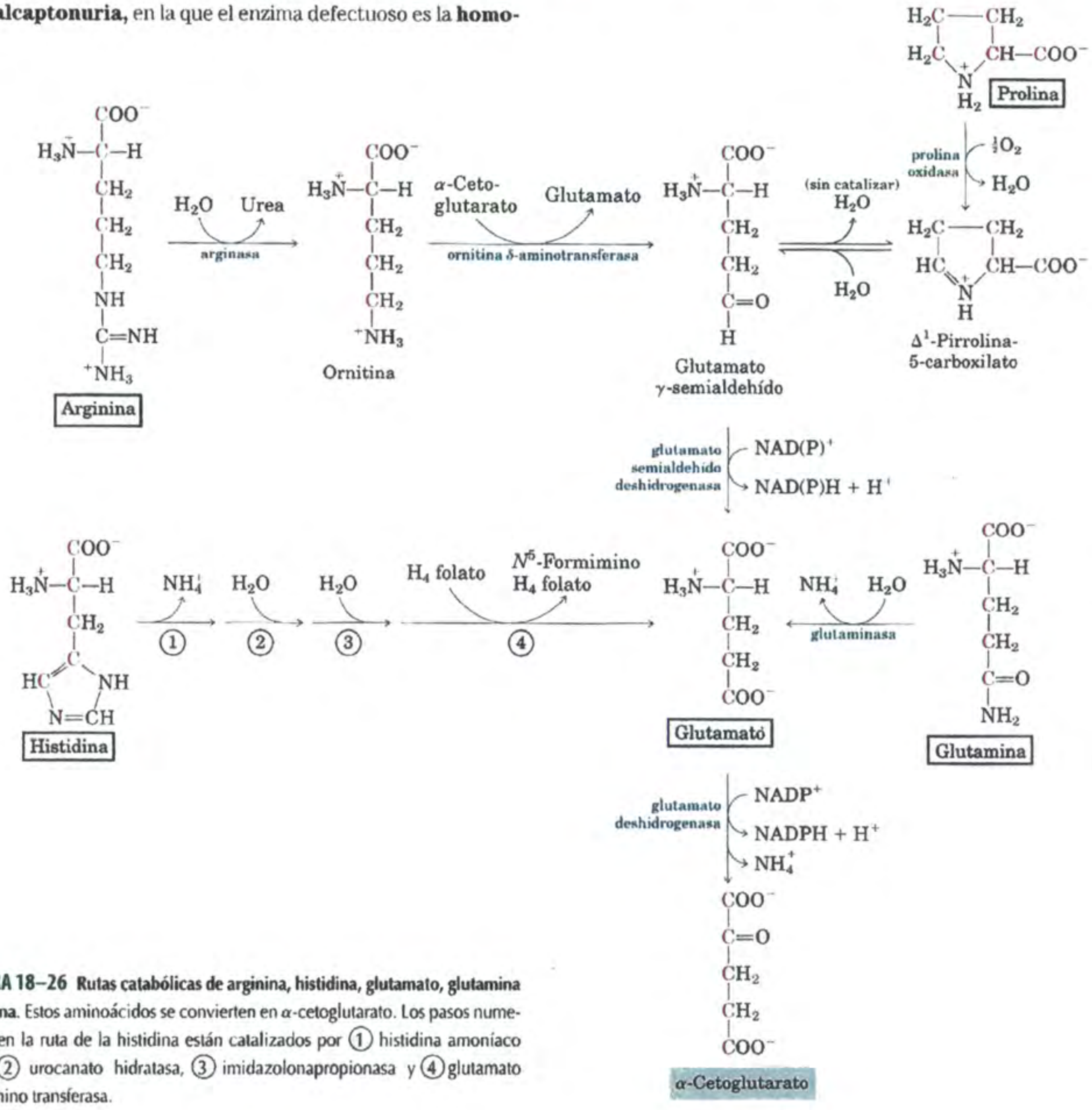


FIGURA 18–26 Rutas catabólicas de arginina, histidina, glutamato, glutamina y prolina. Estos aminoácidos se convierten en α-cetoglutarato. Los pasos numerados en la ruta de la histidina están catalizados por ① histidina amoníaco liasa, ② urocanato hidratasa, ③ imidazolonapropionasa y ④ glutamato formimino transferasa.

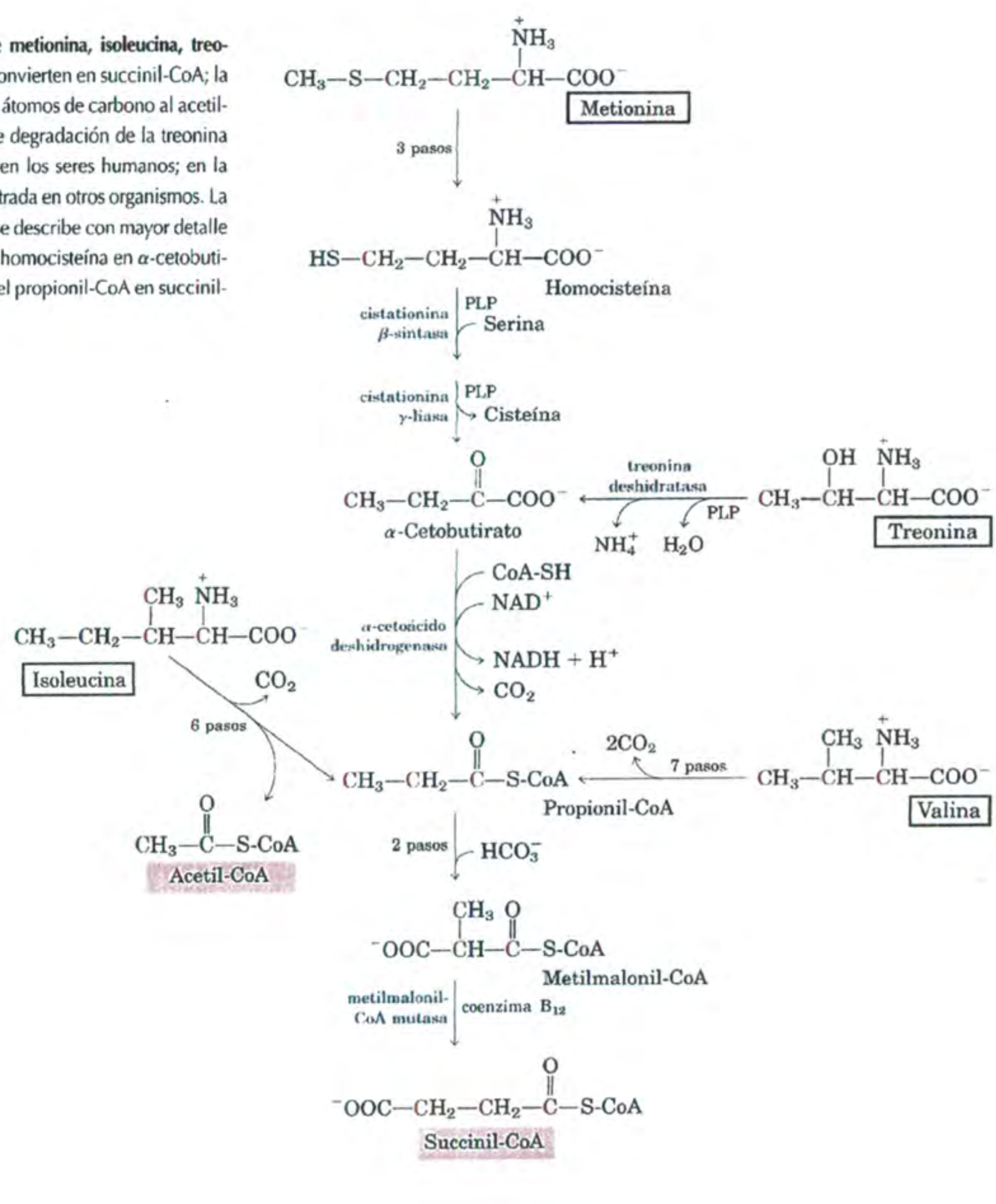
bonados. La estructura cíclica de la prolina se abre por oxidación del carbono más alejado del grupo carboxílico creando una base de Schiff, que se hidroliza dando un semialdehído lineal, el glutamato γ-semialdehído. Éste vuelve a oxidarse en el mismo carbono produciendo glutamato. La acción de la glutaminasa, o cualquiera de las diversas reacciones enzimáticas en las que la glutamina cede su nitrógeno amídico a algún aceptor, convierte la glutamina en glutamato. La transaminación o desaminación del glutamato produce α-cetoglutarato.

La **arginina** y la **histidina** contienen cinco carbonos adyacentes y un sexto carbono unido a través de un átomo de nitrógeno. La conversión catabólica de estos aminoácidos en glutamato es, por tanto, algo más compleja que la ruta de la prolina o la glutamina (Fig. 18–26). La arginina se convierte en el esqueleto pentacarbonado de la ornitina en el ciclo de la urea (véase la Fig. 18–10) y la ornitina se transamina a glutamato γ-semilaldehído. La conversión de la histidina en glutamato de cinco carbonos tiene lugar mediante una ruta de varios pasos; el carbono extra se elimina en un paso que utiliza tetrahidrofolato como cofactor.

Cuatro aminoácidos se convierten en succinil-CoA

Los esqueletos carbonados de la metionina, la isoleucina, la treonina y la valina se degradan a través de rutas que producen succinil-CoA **(Fig. 18–27)**, un intermediario del ciclo del ácido cítrico. La **metionina** cede su grupo metilo a través de la *S*-adenosilmetionina a uno de los diversos aceptores posibles, mientras que tres de sus cuatro carbonos restantes se convierten en el propionato del propionil-CoA, un precursor del succinil-CoA. La **isoleucina** experimenta transaminación, seguida de la descarboxilación oxidativa del α-cetoácido resultante. El esqueleto pentacarbonado restante vuelve a oxidarse, dando acetil-CoA y propionil-CoA. La **valina** experimenta transaminación seguida de descarboxilación, y a continuación una serie de reacciones de oxidación convierte los cuatro carbonos restantes en propionil-CoA. Algunas partes de las rutas degradativas de la valina y de la isoleucina están estrechamente relacionadas con pasos de la degradación de ácidos grasos (véase la Fig. 17–8a). En los tejidos humanos, la **treonina** también se convierte en dos pasos en propionil-CoA. Ésta es la ruta principal de degra-

FIGURA 18–27 Rutas catabólicas de metionina, isoleucina, treonina y valina. Estos aminoácidos se convierten en succinil-CoA; la isoleucina también aporta dos de sus átomos de carbono al acetil-CoA (véase la Fig. 18–21). La ruta de degradación de la treonina aquí mostrada es la que tiene lugar en los seres humanos; en la Fig. 18–19 se muestra una ruta encontrada en otros organismos. La ruta de la metionina a homocisteína se describe con mayor detalle en la Fig. 18–18; la conversión de la homocisteína en α-cetobutirato en la Fig. 22–14; la conversión del propionil-CoA en succinil-CoA en la Figura 17–11.



dación de la treonina en el ser humano (véase la Fig. 18–19 para la ruta alternativa). El mecanismo del primer paso es análogo al catalizado por la serina deshidratasa, por lo que la serina y la treonina deshidratasas podrían ser el mismo enzima.

El propionil-CoA formado a partir de estos tres aminoácidos se convierte en succinil-CoA a través de una ruta descrita en el Capítulo 17: carboxilación a metilmalonil-CoA, epimerización del metilmalonil-CoA y conversión en succinil-CoA por la metilmalonil-CoA mutasa, dependiente del coenzima B_{12} (véase la Fig. 17–11). En la rara enfermedad genética denominada acidemia metilmalónica, falta la metilmalonil-CoA mutasa, lo que provoca consecuencias metabólicas graves (Tabla 18–2; Recuadro 18–2).

RECUADRO 18–2 MEDICINA Detectives científicos resuelven un crimen misterioso

La verdad puede ser a veces más extraña que la ficción, o al menos tan extraña como una película filmada expresamente para la televisión. Tomemos, por ejemplo el caso de Patricia Stallings. Declarada culpable del asesinato de su hijo pequeño, fue sentenciada a cadena perpetua, si bien después fue hallada inocente gracias a la investigación detectivesca médica de tres científicos obstinados.

La historia empezó en el verano de 1989 cuando Stallings llevó a su hijo de tres meses, Ryan, a las urgencias del Cardinal Glennon Children's Hospital de St. Louis. El niño padecía dificultad respiratoria, vómitos incontrolables y trastornos gástricos. Según el médico que lo atendió, un toxicólogo, los síntomas del niño indicaban que había sido envenenado con etilenglicol, un ingrediente de los anticongelantes, conclusión confirmada por análisis hechos en un laboratorio privado.

Una vez recuperado, el niño fue puesto bajo tutela y Patricia Stallings y su marido, David, podían verlo en visitas vigiladas. Pero cuando el niño enfermó y más tarde murió, después de una visita en la que Patricia había permanecido brevemente sola con el niño, se la acusó de asesinato en primer grado y se la detuvo sin fianza. En aquellos momentos las pruebas parecían claras puesto que tanto el laboratorio privado como el del hospital habían encontrado grandes cantidades de etilenglicol en la sangre del niño y trazas del mismo en un biberón con la que Patricia había alimentado al niño durante su visita.

Pero sin saberlo Patricia había llevado a cabo un experimento brillante. Mientras estaba en prisión, supo que estaba embarazada; posteriormente dio a luz a otro hijo, David Stallings Jr. en febrero de 1990. Inmediatamente ingresó en un orfanato pero a las dos semanas empezó a tener síntomas similares a los de Ryan. A David se le diagnosticó finalmente una enfermedad metabólica rara denominada acidemia metilmalónica (MMA). La MMA, una enfermedad genética recesiva del metabolismo de los aminoácidos, afecta a 1 de cada 48.000 nacidos y presenta síntomas casi idénticos a los producidos por el envenenamiento con etilenglicol.

Patricia no podía de ningún modo haber envenenado a su segundo hijo, pero el fiscal del estado de Missouri no quedó impresionado por los nuevos acontecimientos y prosiguió con el proceso. El tribunal no permitió que el diagnóstico de MMA del segundo hijo fuese aceptado como prueba, y en enero de 1991 Patricia Stallings fue hallada culpable de agresión con arma mortal y condenada a cadena perpetua.

Sin embargo, afortunadamente para Patricia, William Sly, director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de St. Louis, y James Shoemaker, director de un laboratorio de rastreo metabólico, se interesaron en su caso cuando se enteraron en un programa de televisión. Shoemaker llevó a cabo su propio análisis de la sangre de Ryan y no detectó etilenglicol. Él y Sly se pusieron en contacto con Piero Rinaldo, experto en enfermedades metabólicas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Yale, cuyo laboratorio estaba equipado para diagnosticar la MMA a partir de muestras de sangre.

Cuando Rinaldo analizó el suero sanguíneo de Ryan encontró una alta concentración de ácido metilmalónico, que es un producto de degradación de los aminoácidos de cadena ramificada isoleucina y valina, que se acumulan en los pacientes de MMA porque carecen del enzima que debería transformarlo en el siguiente producto de su ruta metabólica. Especialmente revelador según su relato era que la sangre y la orina del niño contenían grandes cantidades de cetonas, lo que constituye otra consecuencia metabólica de la enfermedad. Al igual que Shoemaker, no encontró etilenglicol en una muestra de los fluidos corporales del niño. No se pudo analizar el biberón, ya que había desaparecido misteriosamente. Los análisis de Rinaldo le convencieron de que Ryan había muerto de MMA; pero ¿cómo explicar los resultados de los dos laboratorios que indicaban que el niño tenía etilenglicol en su sangre? ¿Podían estar los dos equivocados?

Cuando Rinaldo obtuvo los informes de los laboratorios, lo que vio, dice, fue "espantoso". Un laboratorio decía que la sangre de Ryan Stallings contenía etilenglicol, aunque el análisis de la muestra de sangre no se ajustaba al perfil del propio laboratorio para una muestra conocida que contenía etilenglicol. "Esto no era solamente un asunto de interpretación cuestionable. La calidad de sus análisis era inaceptable", dice Rinaldo. ¿Y el segundo laboratorio? Según Rinaldo aquel laboratorio detectó un componente anormal en la sangre de Ryan y simplemente "supusieron que era etilenglicol". Las muestras del biberón no habían dado nada anormal, dice Rinaldo, y sin embargo el laboratorio también afirmó que tenían pruebas de la presencia de etilenglicol en el mismo.

Rinaldo presentó sus hallazgos al fiscal del caso, George McElroy, quien al día siguiente convocó una conferencia de prensa. "Ya no creo en los datos de los laboratorios" dijo a los periodistas. Habiendo concluido que Ryan Stallings había muerto efectivamente de MMA, retiró todos los cargos contra Patricia Stallings el 20 de setiembre de 1991.

*Por Michelle Hoffman (1991). *Science* **253**, 931. Copyright 1991 de la American Association for the Advancement of Science.

Los aminoácidos ramificados no se degradan en el hígado

Aunque la mayor parte del catabolismo de los aminoácidos transcurre en el hígado, los tres aminoácidos con cadenas laterales ramificadas (leucina, isoleucina y valina) se oxidan como combustibles principalmente en el músculo, tejido adiposo, riñón y tejido cerebral. Estos tejidos extrahepáticos contienen una aminotransferasa, ausente del hígado, que actúa sobre los tres aminoácidos ramificados produciendo los α-cetoácidos correspondientes **(Fig. 18–28)**. El **complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa** cataliza a continuación la descarboxilación oxidativa de los tres α-cetoácidos, liberando el grupo carboxilo en forma de CO_2 y produciendo el derivado acil-CoA correspondiente. Esta reacción es formalmente análoga a las otras dos descarboxilaciones oxidativas vistas en el Capítulo 16: la oxidación del piruvato a acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (véase la Fig. 16–6) y la oxidación del α-cetoglutarato a succinil-CoA por el complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa (p. 625). De hecho, los tres complejos enzimáticos tienen una estructura semejante y comparten esencialmente el mismo mecanismo de reacción. Participan cinco cofactores (tiamina pirofosfato, FAD, NAD, lipoato y coenzima A), y las tres proteínas de cada complejo catalizan reacciones homólogas. Es un caso claro en el que la maquinaria enzimática que evolucionó para catalizar una reacción fue "tomada en préstamo" por duplicación génica y posterior evolución para catalizar reacciones similares en otras rutas.

Experimentos en ratas han demostrado que el complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa está regulado por modificación covalente en respuesta al contenido en aminoácidos de cadena ramificada de la dieta. Cuando no hay exceso de ingestión en la dieta de aminoácidos de cadena ramificada, el complejo enzimático está fosforilado y así inactivado por una proteína quinasa. La adición de un exceso de aminoácidos de cadena ramificada a la dieta provoca la desfosforilación y activación consiguiente del enzima. Recuérdese que el complejo de la piruvato deshidrogenasa está sujeto a una regulación similar por fosforilación y desfosforilación (p. 636).

Existe una enfermedad genética humana relativamente rara en la que estos tres α-cetoácidos ramificados (así como sus aminoácidos precursores, en especial la leucina) se acumulan en la sangre y se "vierten" en la orina. Esta enfermedad, denominada **enfermedad del jarabe de arce en la orina,** debido al olor característico que los α-cetoácidos le confieren a la orina, es el resultado de un complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa defectuoso. Si la enfermedad no se trata da lugar a un desarrollo anormal del cerebro, retraso mental y muerte en la infancia temprana. El tratamiento consiste en un control rígido de la dieta, para limitar la ingestión de valina, isoleucina y leucina al mínimo necesario para permitir el crecimiento normal. ■

La asparagina y el aspartato se degradan a oxalacetato

Los esqueletos carbonados de la **asparagina** y del **aspartato** entran en último término en el ciclo del ácido cítrico en forma

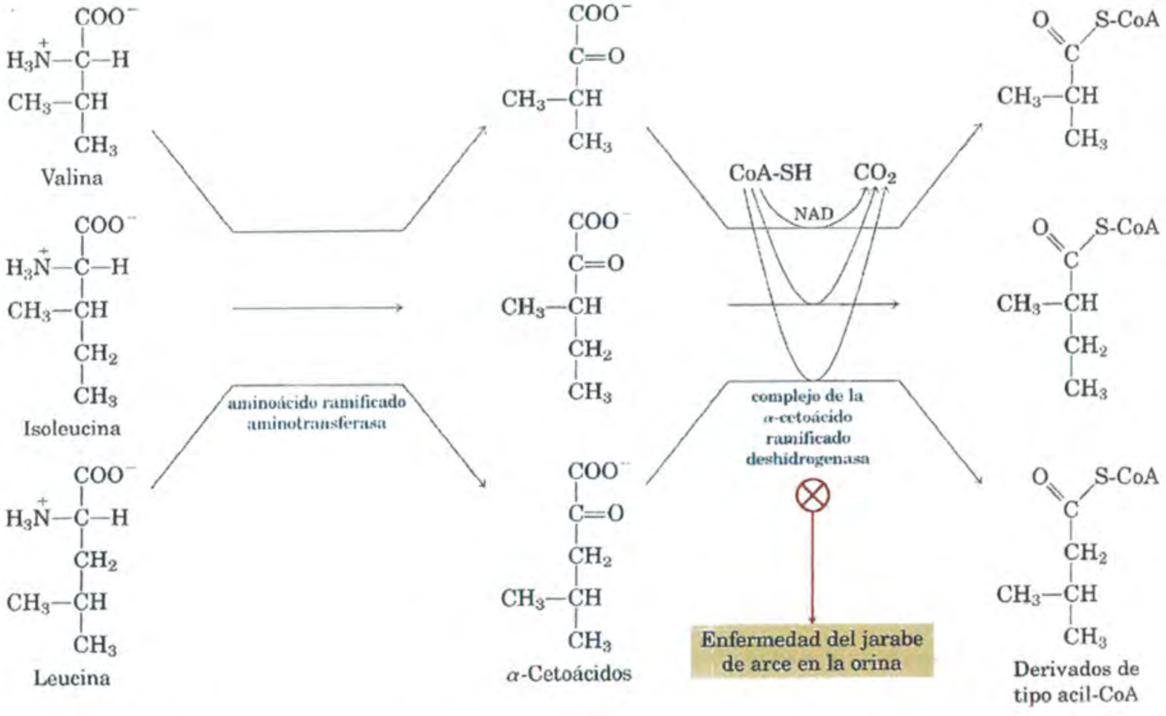


FIGURA 18–28 Rutas catabólicas de los tres aminoácidos ramificados valina, isoleucina y leucina. Las tres rutas, que tienen lugar en tejidos extrahepáticos, comparten los dos primeros enzimas tal como se muestra aquí. El complejo de la α-cetoácido ramificado deshidrogenasa es análogo a los complejos de la piruvato y α-cetoglutarato deshidrogenasas y requiere los mismos cinco cofactores (no mostrados en esta figura). Este enzima es defectuoso en personas con la enfermedad del jarabe de arce en la orina.

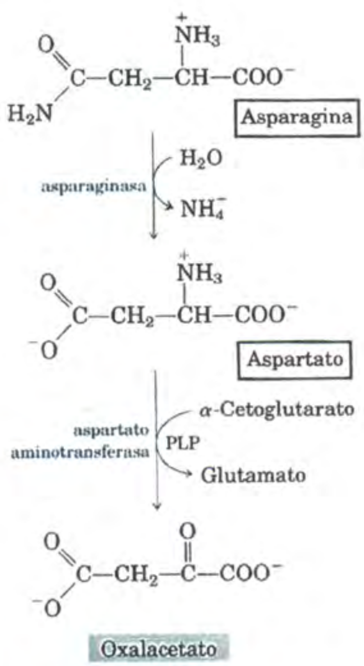


FIGURA 18–29 Ruta catabólica para asparagina y aspartato. Ambos aminoácidos se convierten en oxalacetato.

de oxalacetato. El enzima **asparaginasa** cataliza la hidrólisis de la asparagina para dar aspartato, el cual experimenta transaminación con el α-cetoglutarato, dando glutamato y oxalacetato **(Fig. 18–29)**.

Ya hemos visto de qué modo se degradan los 20 aminoácidos estándar, después de perder sus átomos de nitrógeno, mediante deshidrogenación, descarboxilación y otras reacciones, que ceden parte de sus esqueletos carbonados en la forma de seis metabolitos centrales que puedan entrar en el ciclo del ácido cítrico. Las partes degradadas a acetil-CoA se oxidan completamente a dióxido de carbono y agua, con generación de ATP por fosforilación oxidativa.

De la misma manera que en el caso de glúcidos y lípidos, la degradación de los aminoácidos produce en último término equivalentes de reducción (NADH y $FADH_2$) a través de la acción del ciclo del ácido cítrico. El estudio de los procesos catabólicos concluye en el próximo capítulo con una discusión de la respiración, en la que estos equivalentes de reducción alimentan los procesos oxidativos y generadores de energía finales de los organismos aeróbicos.

RESUMEN 18.3 Rutas de degradación de los aminoácidos

- Después de la eliminación de sus grupos amino, los esqueletos carbonados de los aminoácidos se oxidan a compuestos que pueden entrar en el ciclo del ácido cítrico para ser oxidados a CO_2 y H_2O. Las reacciones de estas rutas requieren diversos cofactores, entre los que se incluyen el tetrahidrofolato y la *S*-adenosilmetionina en reacciones de transferencia de un carbono, y la tetrahidrobiopterina en la oxidación de la fenilalanina por la fenilalanina hidroxilasa.
- Según la naturaleza de su producto final de degradación, algunos aminoácidos se pueden convertir en cuerpos cetónicos, algunos en glucosa y otros en ambos. Así, la degradación de aminoácidos está integrada en el metabolismo intermediario y puede ser crítica para la supervivencia en condiciones en las que los aminoácidos constituyen una fuente significativa de energía metabólica.
- Los esqueletos carbonados de los aminoácidos entran en el ciclo del ácido cítrico a través de cinco intermediarios: acetil-CoA, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato y oxalacetato. Algunos también se degradan a piruvato, que se puede convertir bien en acetil-CoA, bien en oxalacetato.
- Los aminoácidos que producen piruvato son la alanina, la cisteína, la glicina, la serina, la treonina y el triptófano. La leucina, la lisina, la fenilalanina y el triptófano dan acetil-CoA vía acetoacetil-CoA. La isoleucina, la leucina, la treonina y el triptófano también forman acetil-CoA directamente.
- La arginina, el glutamato, la glutamina, la histidina y la prolina, producen α-cetoglutarato; la isoleucina, la metionina, la treonina y la valina producen succinil-CoA; cuatro átomos de carbono de la fenilalanina y la tirosina dan lugar a fumarato; y la asparagina y el aspartato producen oxalacetato.
- Los aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina), a diferencia del resto de aminoácidos, se degradan únicamente en los tejidos extrahepáticos.
- Diversas enfermedades humanas graves pueden relacionarse con defectos genéticos de enzimas del catabolismo de los aminoácidos.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

aminotransferasas 677
transaminasas 677
transaminación 677
piridoxal fosfato (PLP) 677
creatina quinasa 678
desaminación oxidativa 679
L-glutamato deshidrogenada 679
glutamina sintetasa 680
glutaminasa 681
ciclo de la glucosa-alanina 681
amonotélico 682
ureotélico 682
uricotélico 682
ciclo de la urea 682
urea 684
aminoácidos esenciales 686
aminoácidos cetogénicos 688
aminoácidos glucogénicos 688
tetrahidrofolato 689
***S*-adenosilmetionina (adoMet)** 689
tetrahidrobiopterina 692
fenilcetonuria (PKU) 697
oxidasas de función mixta 697
alcaptonuria 698
enfermedad del jarabe de arce en la orina 701

Bibliografía

General

Arias, I.M., Boyer, J.L., Chisari, F.V., Fausto, N., Schachter, D., & Shafritz, D.A. (2001) *The Liver: Biology and Pathobiology*, 4th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Bender, D.A. (1985) *Amino Acid Metabolism*, 2nd edn, Wiley-Interscience, Inc., New York.

Brosnan, J.T. (2001) Amino acids, then and now—a reflection on Sir Hans Krebs' contribution to nitrogen metabolism. *IUBMB Life* **52**, 265–270.

Un recorrido interesante a través de la vida de este importante bioquímico.

Campbell, J.W. (1991) Excretory nitrogen metabolism. In *Environmental and Metabolic Animal Physiology*, 4th edn (Prosser, C.L., ed.), pp. 277–324, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Coomes, M.W. (1997) Amino acid metabolism. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 5th edn (Devlin, T.M., ed.), pp. 779–823, Wiley-Liss, New York.

Frey, P.A. & Hegeman, A.D. (2006) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.

Buena fuente para una discusión en profundidad de las clases de mecanismos enzimáticos descritos en el capítulo.

Hayashi, H. (1995) Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity. *J. Biochem.* **118**, 463–473.

Mazelis, M. (1980) Amino acid catabolism. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* (Stumpf, P.K. & Conn, E.E., eds), Vol. 5: *Amino Acids and Derivatives* (Miflin, B.J., ed.), pp. 541–567, Academic Press, Inc., New York.

Interesante discusión de los diversos destinos de los aminoácidos en plantas.

Metabolismo de los aminoácidos

Christen, P. & Metzler, D.E. (1985) *Transaminases*, Wiley-Interscience, Inc., New York.

Curthoys, N.P. & Watford, M. (1995) Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 133–159.

Fitzpatrick, P.F. (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 355–382.

Eliot, A.C. & Kirsch, J.F. (2004) Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 383–415.

Pencharz, P.B. & Ball, R.O. (2003) Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu. Rev. Nutr.* **23**, 101–116.

La determinación de qué aminoácidos son esenciales en la dieta humana no es un problema trivial, tal como se relata en esta revisión.

Ciclo de la urea

Brusilow, S.W. & Horwich, A.L. (2001) Urea cycle enzymes. In *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, 8th edn (Scriver, C.R., Beaudet, A.C., Sly, W.S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K., & Vogelstein, B., eds), pp. 1909–1963, McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

Fuente autorizada sobre esta ruta.

Holmes, F.L. (1980) Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle. *Fed. Proc.* **39**, 216–225.

Un historiador médico reconstruye los hechos que llevaron al descubrimiento del ciclo de la urea.

Kirsch, J.F., Eichele, G., Ford, G.C., Vincent, M.G., Jansonius, J.N., Gehring, H., & Christen, P. (1984) Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. *J. Mol. Biol.* **174**, 497–525.

Morris, S.M. (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 87–105.

Esta revisión da detalles sobre lo que se sabe acerca de algunos niveles de regulación no cubiertos en este capítulo, tales como la regulación hormonal y la nutricional.

Enfermedades de la degradación de aminoácidos

Ledley, F.D., Levy, H.L., & Woo, S.L.C. (1986) Molecular analysis of the inheritance of phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia in families with both disorders. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1276–1280.

Nyhan, W.L. (1984) *Abnormalities in Amino Acid Metabolism in Clinical Medicine*, Appleton-Century-Crofts, Norwalk, CT.

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, A.W., & Vogelstein, B. (eds) (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, Part 5: *Amino Acids*, McGraw-Hill, Inc., New York.

Scriver, C.R., Kaufman, S., & Woo, S.L.C. (1988) Mendelian hyperphenylalaninemia. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 301–321.

Problemas

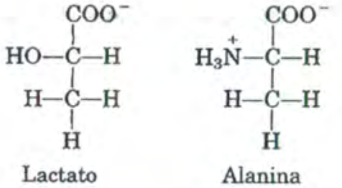
1. Productos de la transaminación de aminoácidos Dibuje la estructura y dé el nombre del α-cetoácido que se forma cuando los siguientes aminoácidos experimentan transaminación con α-cetoglutarato: (a) aspartato, (b) glutamato (c) alanina, (d) fenilalanina.

2. Medida de la actividad alanina aminotransferasa La actividad (velocidad de reacción) de la alanina aminotransferasa se mide normalmente incluyendo un exceso de lactato deshidrogenasa pura y NADH en el sistema de reacción. La velocidad de desaparición de la alanina es igual a la velocidad de desaparición del NADH medida espectrofotométricamente. Explique de qué modo funciona este ensayo.

3. Alanina y glutamina en la sangre El plasma sanguíneo humano normal contiene todos los aminoácidos necesarios para la síntesis de las proteínas corporales, pero no en las mismas concentraciones. La alanina y la glutamina se encuentran en concentraciones mucho mayores que el resto de aminoácidos. Sugiera por qué.

4. Distribución del nitrógeno amínico Si su dieta es rica en alanina pero deficiente en aspartato, ¿se notarán signos de deficiencia de aspartato? Explíquelo.

5. Lactato frente a alanina como combustible metabólico: el coste de la eliminación del nitrógeno Los tres carbonos del lactato y de la alanina tienen estados de oxidación idénticos, por lo que los animales pueden utilizar cualquiera de estas dos fuentes de carbono como combustible metabólico. Compare el rendimiento neto de ATP (moles de ATP por mol de sustrato) para la oxidación completa (a CO_2 y H_2O) del lactato frente a la alanina, cuando se incluye el coste de la excreción de nitrógeno en forma de urea.



Lactato Alanina

6. Toxicidad del amoníaco resultante de una dieta deficiente en arginina En un estudio realizado hace algunos años, se hizo ayunar a gatos durante la noche dándoseles después una sola comida completa en todos los aminoácidos excepto la arginina. A las 2 horas, los niveles de amoníaco

sanguíneo aumentaron desde un nivel normal de 18 μg/L a 140 μg/L y los gatos mostraron los síntomas clínicos de la toxicidad del amoníaco. Un grupo control alimentado con una dieta completa en aminoácidos o una dieta de aminoácidos en la que se había sustituido la arginina por ornitina no mostró síntomas clínicos extraños.

(a) ¿Cuál era el objetivo del ayuno en el experimento?

(b) ¿Qué es lo que hizo aumentar los niveles de amoníaco en el grupo experimental? ¿Por qué la ausencia de arginina condujo a toxicidad por amoníaco? ¿Es la arginina un aminoácido esencial en los gatos? ¿Por qué sí o por qué no?

(c) Etiqueta por qué se puede sustituir la arginina por ornitina.

7. Oxidación del glutamato Escriba una serie de ecuaciones igualadas, y la ecuación de la reacción global neta, que describan la oxidación de 2 moles de glutamato a 2 moles de α-cetoglutarato y 1 mol de urea.

8. Transaminación y ciclo de la urea La aspartato aminotransferasa tiene la actividad más elevada de todas las aminotransferasas hepáticas de mamífero. ¿Por qué?

9. El caso contra la dieta de proteína líquida Una dieta para la reducción de peso muy promocionada hace algunos años requería la ingestión diaria de "proteína líquida" (sopa de gelatina hidrolizada), agua y un surtido de vitaminas. Se había de evitar cualquier otra comida o bebida. Con esta dieta las personas perdían típicamente entre 5 y 7 kg en la primera semana.

(a) Los oponentes argumentaban que la pérdida de peso se debía casi exclusivamente a la pérdida de agua por lo que se recuperaría casi inmediatamente cuando se volviese a la dieta normal. ¿Cuál es la base bioquímica de este argumento?

(b) Varias personas que seguían esta dieta murieron. ¿Cuáles son algunos de los peligros inherentes en la dieta y de qué modo podían conducir a la muerte?

10. Ácidos amino-cetónicos ¿Qué aminoácidos son exclusivamente cetogénicos?

11. Un defecto genético en el metabolismo de los aminoácidos: una historia clínica Un niño de dos años ingresó en el hospital. Su madre indicó que vomitaba frecuentemente, sobre todo después de las comidas. El peso del niño y el desarrollo físico estaban por debajo de lo normal. Su cabello, aunque oscuro, tenía manchas blancas. Una muestra de orina tratada con cloruro férrico ($FeCl_3$) dio un color verde característico de la presencia de fenilpiruvato. El análisis cuantitativo de muestras de orina dio los resultados que se muestran en la siguiente tabla.

Sustancia	Concentración (mM)	
	Orina del paciente	Orina normal
Fenilalanina	7,0	0,01
Fenilpiruvato	4,8	0
Fenil-lactato	10,3	0

(a) Sugiera qué enzima puede ser deficiente en este niño. Proponga un tratamiento.

(b) ¿Por qué aparece la fenilalanina en la orina en grandes cantidades?

(c) ¿Cuál es el origen del fenilpiruvato y del fenil-lactato? ¿Por qué esta ruta (normalmente no funcional) entra en juego cuando aumenta la concentración de fenilalanina?

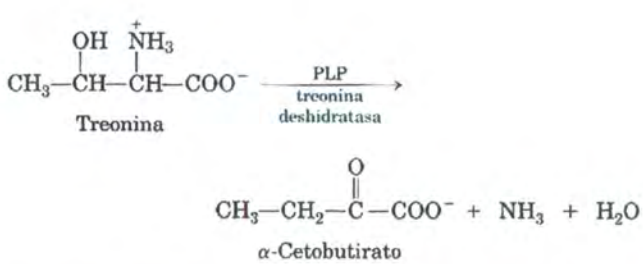
(d) ¿Por qué el pelo del niño tiene manchas blancas?

12. Papel de la cobalamina en el catabolismo de los aminoácidos La anemia perniciosa está producida por una absorción defectuosa de vitamina B_{12}. ¿Cuál es el efecto de esta anomalía sobre el catabolismo de los aminoácidos? ¿Están afectados todos los aminoácidos de igual manera? (Pista: Véase el Recuadro 17–2.)

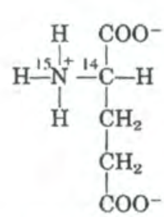
13. Dietas vegetarianas Las dietas vegetarianas pueden proporcionar altas concentraciones de antioxidantes y un perfil lipídico que puede ayudar a prevenir la enfermedad coronaria. No obstante, pueden haber algunos problemas asociados. Se tomaron muestras de un gran grupo de voluntarios que eran vegetarianos estrictos (sin productos animales), lactovegetarianos (vegetarianos que toman diariamente productos lácteos) u omnívoros (individuos con una dieta variada normal que incluye la carne). En cada caso, los voluntarios habían seguido la dieta durante varios años. Las concentraciones sanguíneas de homocisteína y metilmalonato estaban elevadas en el grupo de vegetarianos estrictos, algo menores en el grupo de lactovegetarianos y mucho menores en el grupo omnívoro. Explique el motivo.

14. Anemia perniciosa La carencia de vitamina B_{12} puede aparecer en unas enfermedades genéticas raras que conducen a niveles bajos de B_{12} a pesar de que una dieta normal fuentes cárnicas y lácteas ricas en B_{12}. Esta enfermedad no puede tratarse con suplementos de B_{12} en la dieta. Explique el motivo.

15. Mecanismos de reacción del piridoxal fosfato La treonina se puede descomponer por el enzima treonina deshidratasa que cataliza la conversión de treonina en α-cetobutirato y amoníaco. El enzima utiliza PLP como cofactor. Sugiera un mecanismo para esta reacción, basado en los mecanismos de la Figura 18–6. Observe que esta reacción incluye una eliminación en el carbono β de la treonina.

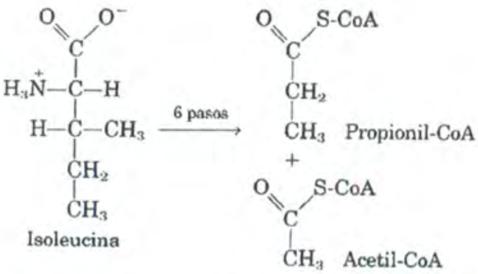


16. Rutas del carbono y del nitrógeno en el metabolismo del glutamato Cuando se degrada oxidativamente [2-^{14}C,^{15}N] glutamato en las células hepáticas de una rata, ¿en qué átomos de los siguientes metabolitos se encontrará cada isótopo? (a) urea, (b) succinato, (c) arginina, (d) citrulina, (e) ornitina, (f) aspartato?

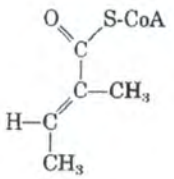


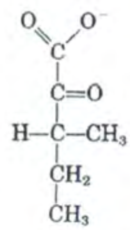
Glutamato marcado

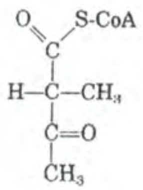
17. Estrategia química del catabolismo de la isoleucina La isoleucina se degrada en una serie de seis pasos a propionil-CoA y acetil-CoA.

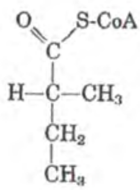


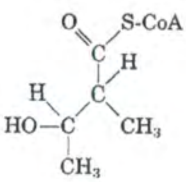
(a) El proceso químico de degradación de la isoleucina incluye estrategias análogas a las utilizadas en el ciclo del ácido cítrico y en la β-oxidación de ácidos grasos. Los intermediarios de la degradación de la isoleucina (I a V) que se muestran a continuación no están en el orden correcto. Utilice su conocimiento y comprensión del ciclo del ácido cítrico y de la ruta de la β-oxidación para ordenar los intermediarios en la secuencia metabólica adecuada para la degradación de la isoleucina.


I


II


III

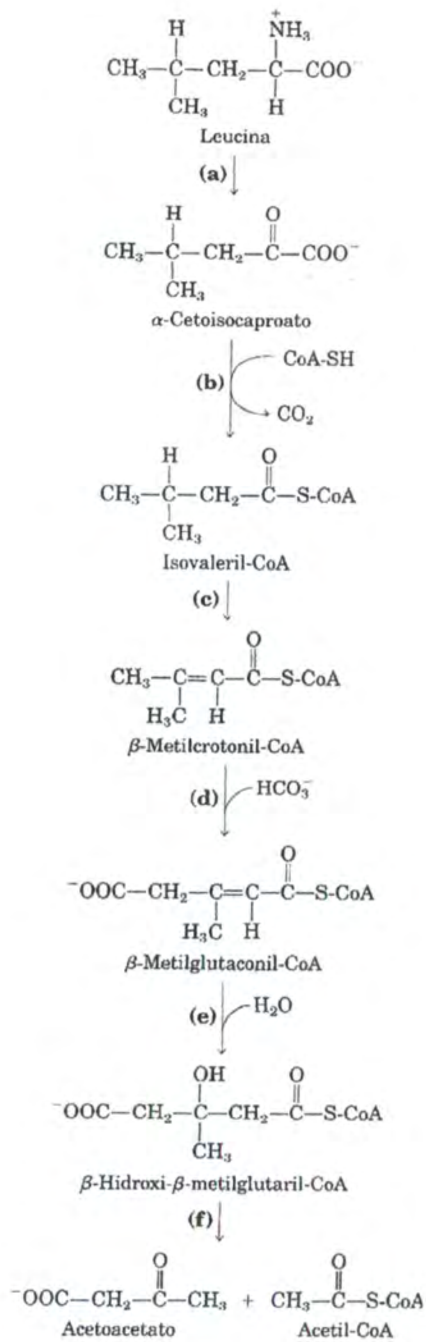

IV


V

(b) Para cada paso propuesto, describa el proceso químico, dé un ejemplo análogo del ciclo del ácido cítrico o de la ruta de la β-oxidación (donde sea posible) e indique los cofactores necesarios.

18. Papel del piridoxal fosfato en el metabolismo de la glicina El enzima serina hidroximetiltransferasa requiere piridoxal fosfato como cofactor. Proponga un mecanismo para la reacción catalizada por este enzima, en la dirección de degradación de la serina (producción de glicina). (Pista: Vea las Figs. 18–19 y 18–20b).

19. Rutas paralelas de la degradación de aminoácidos y de ácidos grasos El esqueleto carbonado de la leucina se degrada mediante una serie de reacciones análogas a las del ciclo del ácido cítrico y de la β-oxidación. Para cada reacción, de (a) hasta (f), mostradas a la derecha, indique su tipo, proporcione un ejemplo análogo del ciclo del ácido cítrico o de la ruta de la β-oxidación (donde sea posible) e indique los cofactores necesarios.



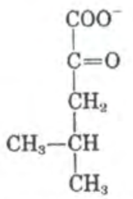
Problema de análisis de datos

20. Enfermedad del jarabe de arce en la orina En la Figura 18–28 se muestra la ruta de degradación de los aminoácidos de cadena ramificada y el sitio del defecto bioquímico que produce la enfermedad del jarabe de arce en la orina. Los hallazgos iniciales que condujeron al descubrimiento del defecto se presentaron en tres artículos publicados a finales de la década de 1950 y principios de la década de 1960. Este problema sigue la historia de los hallazgos desde las observaciones clínicas iniciales hasta la propuesta de un mecanismo.

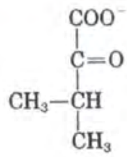
Menkes, Hurst y Craig (1954) presentaron los casos de cuatro hermanos, todos ellos muertos con un conjunto de síntomas similares. En los cuatro casos tanto el embarazo de la madre como el parto habían sido normales. Los primeros 3 a 5 días de la vida de los niños también fueron normales. Pero poco después cada niño empezó a tener convulsiones y los niños murie-

ron entre los 11 días y los 3 meses de edad. La autopsia mostró una hinchazón considerable del cerebro en todos los casos. La orina de los niños tenía un fuerte olor, inusual, de "jarabe de arce", que empezaba a partir del tercer día de vida.

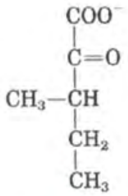
Menkes (1959) publicó datos recogidos de otros seis niños. Todos mostraban síntomas similares a los antes descritos y murieron entre los 15 días y los 20 meses después del nacimiento. En un caso Menkes pudo obtener muestras de orina durante el último mes de vida del lactante. Cuando trató la orina con 2,4-dinitrofenilhidrazona, que forma precipitados coloreados con los compuestos cetónicos encontró los tres α-cetoácidos en cantidades inusualmente elevadas:



α-Cetoisocaproato



α-Cetoisovalerato

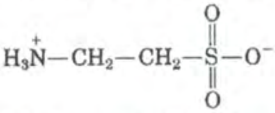


α-Ceto-β-metil-n-valerato

(a) Estos α-cetoácidos se producen por desaminación de aminoácidos. Para cada uno de los α-cetoácidos antes mostrados, dibuje y nombre el aminoácido del que procede.

Dancis, Levis y Westall (1960) recogieron datos adicionales que los llevaron a proponer el defecto bioquímico mostrado en la Figura 18–28. En un caso examinaron un paciente cuya orina presentó por primera vez el olor a jarabe de arce a los 4 meses de edad. A los 10 meses (marzo de 1956) se ingresó el niño en el hospital porque tenía fiebre y mostraba un gran retraso en el desarrollo motor. A los 20 meses (enero de 1957), volvió a ingresar y se lo encontraron los síntomas neurológicos degenerativos ya vistos en casos previos de enfermedad del jarabe de arce en la orina; murió poco después. En la tabla inferior se muestran los resultados de sus análisis de sangre y orina, junto con los valores normales de cada componente.

(b) En la tabla se incluye la taurina, aminoácido que normalmente no se encuentra en las proteínas. Se produce a menudo como subproducto de lesiones celulares. Su estructura es:



Basándose en su estructura y la información contenida en este capítulo, ¿cuál es el aminoácido con más probabilidades de ser el precursor de la taurina? Razónelo.

(c) En comparación con los valores normales dados en la tabla, ¿qué aminoácidos mostraron niveles significativamente elevados en la sangre del paciente en enero de 1957? ¿Cuáles en la orina del paciente?

Basándose en sus resultados y en su conocimiento de la ruta mostrada en la Figura 18–28, Dancis y colaboradores concluyeron: "aunque a los autores les parece muy probable que el bloqueo primario se encuentra en la ruta degradativa de los aminoácidos de cadena ramificada, esto no puede quedar establecido de manera absoluta".

(d) ¿De qué modo los datos aquí presentados apoyan esta conclusión?

(e) ¿Qué datos aquí presentados *no* se ajustan a este modelo de la enfermedad del jarabe de arce en la orina? ¿Cómo explica estos datos aparentemente contradictorios?

(f) ¿Qué datos necesitaría para poder estar más seguro de su conclusión?

Referencias

Dancis, J., Levitz, M., & Westall, R. (1960) Maple syrup urine disease: branched-chain keto-aciduria. *Pediatrics* **25**, 72–79.

Menkes, J.H. (1959) Maple syrup disease: isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics* **23**, 348–353.

Menkes, J.H., Hurst, P.L., & Craig J.M. (1954) A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* **14**, 462-466.

	Orina (mg/24 h)			Plasma (mg/mL)	
	Normal	Paciente		Normal	Paciente
Aminoácido(s)		Marzo 1956	Enero 1957		Enero 1957
Ácido aspártico	1–2	0,2	1,5	0,1–0,2	0,04
Ácido glutámico	1,5–3	0,7	1,6	1,0–1,5	0,9
Alanina	5–15	0,2	0,4	3,0–4,8	0,6
Arginina	1,5–3	0,3	0,7	0,8–1,4	0,8
Asparagina y glutamina	5–15	0,4	0	3,0–5,0	2,0
Cistina	2–4	0,5	0,3	1,0–1,5	0
Fenilalanina	2–4	0,4	2,6	1,0–1,7	0,8
Glicina	20–40	4,6	20,7	1,0–2,0	1,5
Histidina	8–15	0,3	4,7	1,0–1,7	0,7
Isoleucina	2–5	2,0	13,5	0,8–1,5	2,2
Leucina	3–8	2,7	39,4	1,7–2,4	14,5
Lisina	2–12	1,6	4,3	1,5–2,7	1,1
Metionina	2–5	1,4	1,4	0,3–0,6	2,7
Ornitina	1–2	0	1,3	0,6–0,8	0,5
Prolina	2–4	0,5	0,3	1,5–3,0	0,9
Serina	5–15	1,2	0	1,3–2,2	0,9
Taurina	1–10	0,2	18,7	0,9–1,8	0,4
Tirosina	4–8	0,3	3,7	1,5–2,3	0,7
Treonina	5–10	0,6	0	1,2–1,6	0,3
Triptófano	3–8	0,9	2,3	No medido	0
Valina	2–4	1,6	15,4	2,0–3,0	13,1

> Si se nos presenta una idea no debemos rechazarla sólo porque no está de acuerdo con las deducciones lógicas de una teoría aceptada.
>
> —*Claude Bernard,* Introducción al estudio de la Medicina Experimental, *1813*
>
> El aspecto de la presente situación de consenso que considero más extraordinario y admirable es el altruismo y la generosidad con los que los antiguos oponentes de la hipótesis quimiosmótica no sólo han llegado a aceptarla sino que la han promovido activamente al estatus de teoría.
>
> —*Peter Mitchell, Conferencia Nobel, 1978*

19

Fosforilación oxidativa y fotofosforilación

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

FOTOSÍNTESIS: CAPTACIÓN DE LA ENERGÍA LUMINOSA

La fosforilación oxidativa es la culminación del metabolismo productor de energía en los organismos aeróbicos. Todos los pasos oxidativos en la degradación de glúcidos, grasas y aminoácidos convergen en esta etapa final de la respiración celular en la que la energía de la oxidación impulsa la síntesis de ATP. La fotofosforilación es la forma por la cual los organismos fotosintéticos capturan la energía de la luz solar, la fuente fundamental de energía en la biosfera, y la utilizan para sintetizar ATP. La fosforilación oxidativa y la fotofosforilación aportan conjuntamente la mayor parte del ATP sintetizado por la mayor parte de los organismos la mayor parte de las veces.

En los eucariotas la oxidación fosforilativa tiene lugar en la mitocondria y la fotofosforilación en los cloroplastos. En la fosforilación oxidativa se produce la *reducción* de O_2 a H_2O gracias a los electrones cedidos por el NADH y el $FADH_2$ y tiene lugar tanto en la luz como en la oscuridad. En la fotofosforilación se produce la *oxidación* de H_2O a O_2 con $NADP^+$ como aceptor electrónico fundamental y depende absolutamente de la energía de la luz. A pesar de sus diferencias, estos dos procesos convertidores de la energía de gran eficiencia transcurren a través de mecanismos muy similares.

Nuestros conocimientos actuales sobre la síntesis del ATP en la mitocondria y en los cloroplastos se basan en la hipótesis, introducida por Peter Mitchell en 1961, según la cual las diferencias transmembrana en la concentración de protones son el reservorio de la energía obtenida a partir de las reacciones biológicas de oxidación. Esta **teoría quimiosmótica** está actualmente aceptada como uno de los grandes principios unificadores de la biología del siglo XX. Proporciona un conocimiento de los procesos de la fosforilación oxidativa y de la fotofosforilación así como sobre transducciones de energía aparentemente tan dispares como son el transporte activo a través de membranas y el movimiento de los flagelos bacterianos.

Existen tres aspectos mecánicamente similares entre la oxidación fosforilativa y la fotofosforilación. (1) En ambos procesos interviene un flujo de electrones a través de una cadena de transportadores ligados a membrana. (2) La energía libre

puesta a disposición por este flujo de electrones "cuesta abajo" (exergónico) está acoplada al transporte "cuesta arriba" de protones a través de una membrana impermeable a los protones, conservándose la energía libre de oxidación de los combustibles metabólicos en forma de potencial electroquímico transmembrana (p. 390). (3) El flujo transmembrana de protones a favor de su gradiente de concentración mediante canales proteicos específicos proporciona la energía libre para la síntesis de ATP, catalizada por un complejo proteico asociado a la membrana (la ATP sintasa) que acopla el flujo de protones a la fosforilación del ATP.

En este capítulo consideramos en primer lugar la fosforilación oxidativa. Empezaremos con la descripción de los componentes de la cadena de transferencia electrónica, su organización en forma de grandes complejos funcionales en la membrana mitocondrial interna, la vía de flujo electrónico a través de ellos y el movimiento de protones asociado a dicho flujo. Pasaremos revista a continuación al extraordinario complejo enzimático que, mediante "catálisis rotacional", captura la energía del flujo de protones en forma de ATP. Continuaremos con los mecanismos reguladores que coordinan la fosforilación oxidativa con las muchas rutas catabólicas en las que los combustibles son oxidados. También escribiremos el papel que juega la mitocondria en la termogénesis, la síntesis de esteroides y la apoptosis. Con este conocimiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial pasaremos a la fotofosforilación, empezando por la absorción de la luz por los pigmentos fotosintéticos y continuando con el flujo de electrones impulsado por la luz desde el H_2O al $NADP^+$ y las bases moleculares del acoplamiento del flujo de electrones y protones. También consideraremos las similitudes en estructura y mecanismo entre las ATP sintasas de cloroplastos y mitocondrias, y la base evolutiva de la conservación de dicho mecanismo.

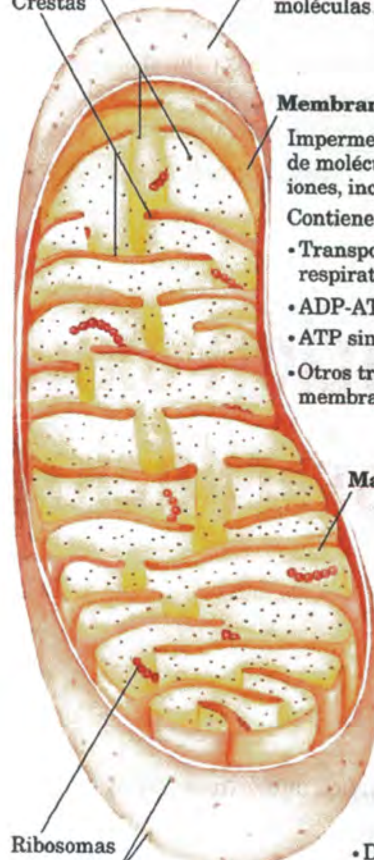


FIGURA 19–1 Anatomía bioquímica de una mitocondria. Los repliegues (crestas) de la membrana interna le confieren una gran área superficial. La membrana interna de una sola mitocondria de una célula hepática puede tener más de 10.000 conjuntos de sistemas de transferencia de electrones (cadenas respiratorias) y de moléculas de ATP sintasa, distribuidas por toda la superficie de la membrana interna. Las mitocondrias del corazón, con gran profusión de crestas y, por tanto, un área de la membrana interna mucho mayor, tienen más de tres veces el número de conjuntos de sistemas de transferencia electrónica que las mitocondrias hepáticas. La reserva mitocondrial de coenzimas e intermediarios está separada funcionalmente de la del citosol. Las mitocondrias de invertebrados, plantas y microbios eucariotas son similares a la que se muestra aquí, si bien existe mucha variación en tamaño, forma y grado de repliegue de la membrana interna.

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

19.1 Reacciones de transferencia de electrones en las mitocondrias

El descubrimiento de Eugene Kennedy y Albert Lehninger en 1948 de que la mitocondria es el sitio en donde se realiza la fosforilación oxidativa en los eucariotas marcó el inicio de la fase moderna de los estudios sobre las transducciones biológicas de energía. Las mitocondrias, al igual que las bacterias gram-negativas, tienen dos membranas **(Fig. 19–1)**. La membrana mitocondrial externa es fácilmente permeable a pequeñas moléculas (M_r <5.000) e iones, que se mueven libremente a través de canales transmembrana compuestos por una familia de proteínas integrales de membrana llamadas porinas. La membrana interna es impermeable a la mayoría de moléculas pequeñas e iones, incluido el protón (H^+); las únicas especies que cruzan esta membrana lo hacen a través de transportadores específicos.

Albert L. Lehninger, 1917–1986

La membrana interna aloja los componentes de la cadena respiratoria y la ATP sintasa. La matriz mitocondrial, el espacio acotado por la membrana interna, contiene el complejo de la piruvato deshidrogenasa y los enzimas del ciclo del ácido cítrico, de la ruta de la β-oxidación de los ácidos grasos y de las rutas de oxidación de los aminoácidos, es decir, todas las rutas de oxidación de combustibles excepto la glucólisis, que tiene lugar en el citosol. Debido a que la membrana interna tiene una permeabilidad selectiva, separa los intermediarios y enzimas de las rutas metabólicas citosólicas de los de los procesos metabólicos

que se producen en la matriz. Sin embargo, el piruvato, los ácidos grasos y los aminoácidos o sus derivados α-ceto son llevados por transportadores específicos a la matriz para poder acceder a la maquinaria del ciclo del ácido cítrico. El ADP y el P_i son transportados específicamente al interior de la matriz al mismo tiempo que el recién sintetizado ATP es transportado al exterior.

Los electrones son canalizados hacia aceptores universales de electrones

La fosforilación oxidativa empieza con la entrada de electrones en la cadena respiratoria. La mayor parte de dichos electrones provienen de la acción de deshidrogenasas que captan electrones de vías catabólicas y los canalizan hacia aceptores universales de electrones: nucleótidos de nicotinamida (NAD^+ o $NADP^+$) o nucleótidos de flavina (FMN o FAD).

Las **deshidrogenasas ligadas a nucleótidos de nicotinamida** catalizan reacciones reversibles de los tipos generales siguientes:

$$\text{Sustrato reducido} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{sustrato oxidado} + NADH + H^+$$

$$\text{Sustrato reducido} + NADP^+ \rightleftharpoons \text{sustrato oxidado} + NADPH + H^+$$

La mayoría de deshidrogenasas que participan en el catabolismo son específicas para el NAD^+ como aceptor electrónico (Tabla 19–1). Algunas están localizadas en el citosol y otras en la mitocondria, existiendo también otras con isozimas tanto mitocondriales como citosólicos.

Las deshidrogenasas ligadas al NAD eliminan dos átomos de hidrógeno de sus sustratos. Uno es transferido en forma de ión hidruro ($:H^-$) al NAD^+ mientras que el otro aparece como H^+ en el medio (véase la Fig. 13–24). El NADH y el NADPH son transportadores electrónicos hidrosolubles que se asocian *reversiblemente* con deshidrogenasas. El NADH transporta los electrones que provienen de reacciones catabólicas a su punto de entrada en la cadena respiratoria, el complejo de la NADH deshidrogenasa que se describe más adelante. El NADPH generalmente suministra electrones a reacciones anabólicas. Las células mantienen reservas separadas de NADPH y NADH, con potenciales redox diferentes. Esto se consigue manteniendo las razones [forma reducida]/[forma oxidada] relativamente alta para el NADPH y relativamente baja para el NADH. Ni el NADH ni el NADPH pueden atravesar la membrana interna de la mitocondria, pero los electrones que transportan pueden ser lanzados a su través indirectamente, tal como veremos más adelante.

Las **flavoproteínas** contienen un nucleótido de flavina, FMN o FAD, fuertemente unido, a veces de manera covalente (véase la Fig. 13–27). El nucleótido de flavina oxidado puede aceptar un electrón (dando la forma de semiquinona) o dos (produciendo $FADH_2$ o $FMNH_2$). La transferencia electrónica se da gracias a que la flavoproteína tiene un potencial de reducción mayor que el del compuesto oxidado. El potencial de reducción estándar de un nucleótido de flavina, a diferencia de lo que sucede con el NAD o el NADP, depende de la proteína a la que está asociado. Interacciones locales con grupos funcionales de la proteína distorsionan los orbitales electrónicos del anillo de flavina, con lo que varía la estabilidad relativa de las formas oxidada y reducida. El potencial de reducción estándar pertinente es, por tanto, el de la flavoproteína concreta, no el del FAD o FMN aislados, habiéndose de considerar al nucleótido de flavina como parte del sitio activo de la flavoproteína y no como un reactivo o producto en la reacción de transferencia electrónica. Debido a que las flavoproteínas pueden participar en transferencias de uno o de dos electrones, pueden actuar como intermedios entre reacciones en las que se ceden dos electrones (como sucede en las deshidrogenaciones) y en aquellas en las que se acepta un solo electrón (como en la reducción de una quinona a hidroquinona descrita más adelante).

TABLA 19–1 Algunas reacciones importantes catalizadas por deshidrogenasas ligadas a NAD(P)H

Reacción*	Localización†
Ligadas a NAD	
α-Cetoglutarato + CoA + NAD^+ $\rightleftharpoons$ succinil-CoA + CO_2 + NADH + H^+	M
L-Malato + NAD^+ $\rightleftharpoons$ oxalacetato + NADH + H^+	M y C
Piruvato + CoA + NAD^+ $\rightleftharpoons$ acetil-CoA + CO_2 + NADH + H^+	M
Gliceraldehído 3-fosfato + P_i + NAD^+ $\rightleftharpoons$ 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H^+	C
Lactato + NAD^+ $\rightleftharpoons$ piruvato + NADH + H^+	C
β-Hidroxiacil-CoA + NAD^+ $\rightleftharpoons$ β-cetoacil-CoA + NADH + H^+	M
Ligadas a NADP	
Glucosa 6-fosfato + $NADP^+$ $\rightleftharpoons$ 6-fosfogluconato + NADPH + H^+	C
Ligadas a NAD o NADP	
L-Glutamato + H_2O + $NAD(P)^+$ $\rightleftharpoons$ α-cetoglutarato + NH_4^+ + NAD(P)H	M
Isocitrato + $NAD(P)^+$ $\rightleftharpoons$ α-cetoglutarato + CO_2 + NAD(P)H + H^+	M y C

*Estas reacciones así como sus enzimas se discuten en los Capítulos 14 a 18.

†M indica mitocondria; C, citosol.

Los electrones pasan a través de una serie de transportadores unidos a membrana

La cadena respiratoria mitocondrial consta de una serie de transportadores electrónicos que actúan secuencialmente, la mayoría de ellos proteínas integrales con grupos prostéticos capaces de aceptar y ceder uno o dos electrones. Hay tres tipos de transferencias electrónicas en la fosforilación oxidativa: (1) transferencia directa de electrones, tal como sucede en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+}; (2) transferencia de un átomo de hidrógeno ($H^+ + e^-$) y (3) transferencia de un ión hidruro (:H^-) portador de dos electrones. El término **equivalente de reducción** se usa para designar el equivalente de un electrón sencillo que se transfiere en una reacción de oxidación–reducción.

Además del NAD y de las flavoproteínas, hay otros tres tipos de moléculas transportadoras de electrones que funcionan en la cadena respiratoria: una quinona hidrofóbica (ubiquinona) y dos tipos diferentes de proteínas con hierro (citocromos y proteínas ferro-sulfuradas). La **ubiquinona** (también llamada **coenzima Q** o sencillamente **Q**) es una benzoquinona liposoluble que contiene una larga cadena lateral isoprenoide **(Fig. 19–2)**. La plastoquinona (presente en cloroplastos) y la menaquinona (presente en bacterias) son compuestos estrechamente relacionados y que tienen misiones análogas a las de la ubiquinona; todos ellos transportan electrones en cadenas de transferencia electrónica asociadas a membranas. La ubiquinona puede aceptar un electrón, transformándose en el radical semiquinona (•QH), o dos electrones, formando ubiquinol (QH_2) (Fig. 19–2). Al igual que las flavoproteínas transportadoras es, por tanto, capaz de actuar como puente entre un dador de dos electrones y un aceptor de un electrón. Debido a que la ubiquinona es al mismo tiempo pequeña e hidrofóbica, puede difundir libremente dentro de la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna y puede hacer de lanzadera de equivalentes de reducción entre otros transportadores electrónicos de la membrana menos móviles. Además, debido a que transporta tanto electrones como protones, juega un papel central en el acoplamiento del flujo electrónico al movimiento de protones.

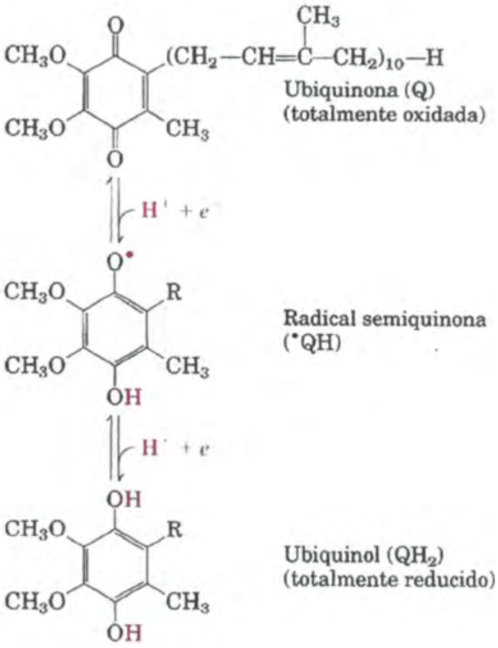


FIGURA 19–2 Ubiquinona (Q, o coenzima Q). La reducción completa de la ubiquinona requiere dos electrones y dos protones, y se produce en dos pasos a través del radical semiquinona intermedio.

Los **citocromos** son proteínas con una intensa absorción de la luz visible característica, debida a la presencia del grupo prostético hemo que contiene hierro **(Fig. 19–3)**. Las mitocon-

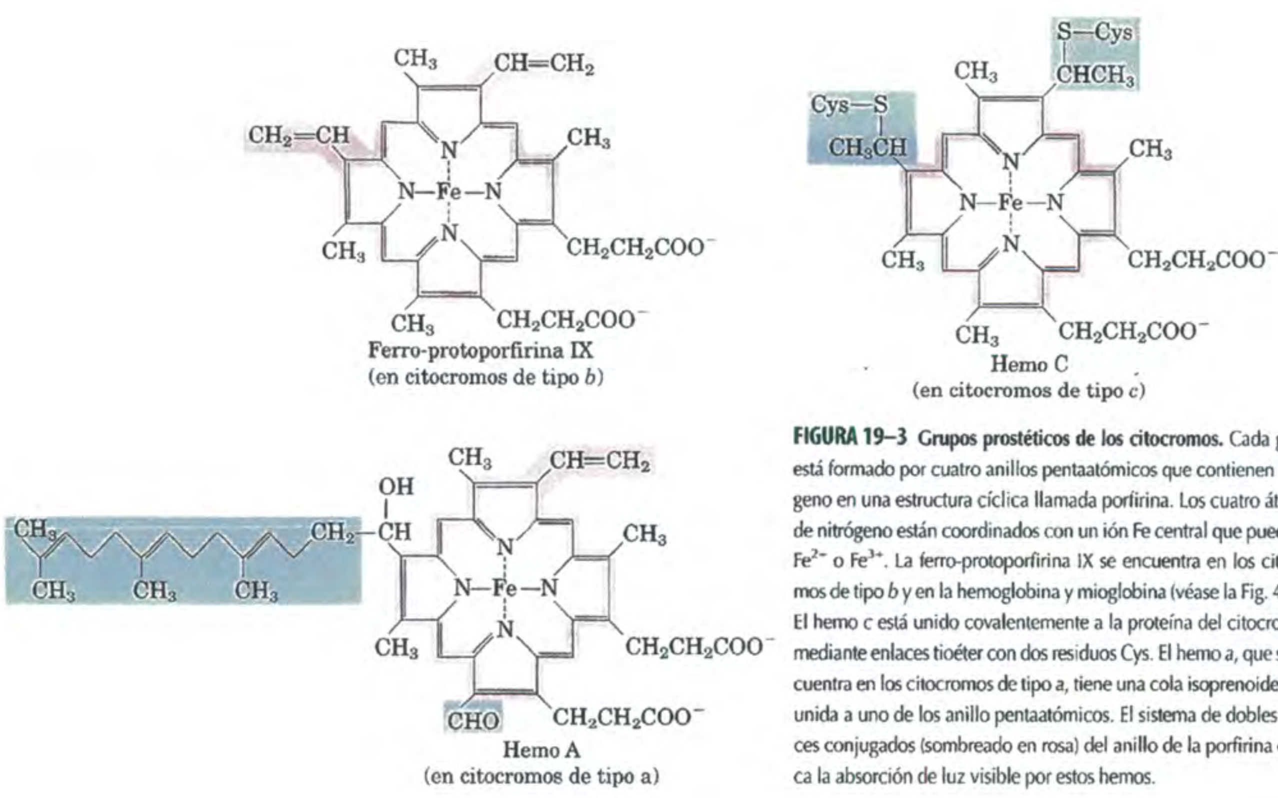


FIGURA 19–3 Grupos prostéticos de los citocromos. Cada grupo está formado por cuatro anillos pentaatómicos que contienen nitrógeno en una estructura cíclica llamada porfirina. Los cuatro átomos de nitrógeno están coordinados con un ión Fe central que puede ser Fe^{2+} o Fe^{3+}. La ferro-protoporfirina IX se encuentra en los citocromos de tipo *b* y en la hemoglobina y mioglobina (véase la Fig. 4–16). El hemo c está unido covalentemente a la proteína del citocromo c mediante enlaces tioéter con dos residuos Cys. El hemo *a*, que se encuentra en los citocromos de tipo a, tiene una cola isoprenoide larga unida a uno de los anillo pentaatómicos. El sistema de dobles enlaces conjugados (sombreado en rosa) del anillo de la porfirina explica la absorción de luz visible por estos hemos.

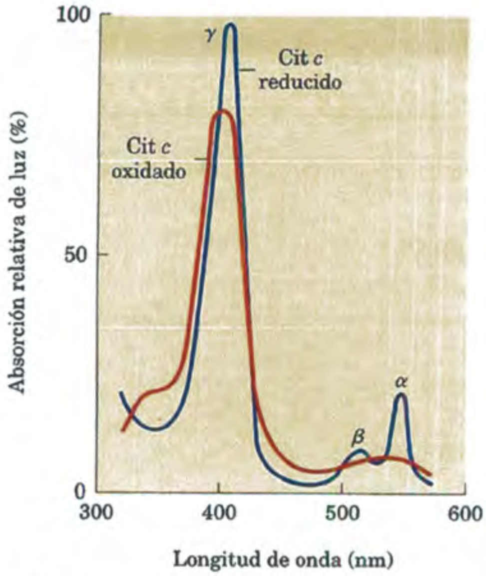


FIGURA 19–4 Espectros de absorción del citocromo c (cit c) en sus formas oxidada (rojo) y reducida (azul). También se indican las bandas α, β y γ características de la forma reducida.

drias contienen tres clases de citocromos que se distinguen por diferencias en su espectro de absorción de la luz y que se designan *a*, *b* y *c*. Cada tipo de citocromo en su estado reducido (Fe^{2+}) tiene tres bandas de absorción en el espectro visible **(Fig. 19–4)**. La banda de longitud de onda más larga está cerca de 600 nm en los citocromos del tipo *a*, cerca de 560 nm en los del tipo *b* y cerca de 550 nm en los del tipo *c*. Para distinguir entre citocromos de un tipo estrechamente relacionados, se utiliza en su nombre la absorción máxima exacta, tal como sucede con el citocromo b_{562}.

Los cofactores hemo de los citocromos *a* y *b* están unidos muy fuertemente, aunque no de manera covalente, a sus proteínas asociadas; los grupos hemo de los citocromos del tipo *c* están unidos de forma covalente a través de residuos Cys (Fig. 19–3). Al igual que con las flavoproteínas, el potencial de reducción estándar del átomo de hierro en el hemo de un citocromo depende de su interacción con las cadenas laterales de la proteína, por lo que es diferente para cada citocromo. Los citocromos de los tipos *a* y *b*, así como algunos del tipo *c*, son proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna. Una excepción sorprendente es el citocromo *c* de la mitocondria, que es una proteína soluble que se asocia mediante interacciones electrostáticas con la parte exterior de la membrana mitocondrial interna.

En las **proteínas ferro-sulfuradas,** el hierro está presente no en forma de hemo sino en asociación con átomos de azufre inorgánico o con átomos de azufre de residuos Cys de la proteína, o con los dos al mismo tiempo. Estos centros ferro-sulfurados (Fe-S) van desde estructuras sencillas con un solo átomo de Fe coordinado a cuatro residuos Cys—SH con centros Fe-S más complejos con dos o cuatro átomos de Fe **(Fig. 19–5)**. Las **proteínas ferro-sulfuradas de Rieske** (denominadas así porque las descubrió John S. Rieske) son una variante de las anteriores, en las que un átomo de Fe está coordinado con dos residuos His en lugar de con dos residuos Cys. Todas las proteínas ferro-sulfuradas participan en transferencias de un electrón en las que se oxida o reduce uno de los átomos de Fe de la agrupación ferro-sulfurada. En la transferencia de electrones mitocondrial actúan como mínimo ocho proteínas Fe-S. Los potenciales de reducción de las proteínas Fe-S varían de –0,65 V a +0,45 V, según el microentorno del hierro en el interior de la proteína.

En la reacción global catalizada por la cadena respiratoria mitocondrial se transportan electrones desde el NADH, el succinato u otro dador electrónico primario a través de las flavoproteínas, la ubiquinona, las proteínas ferro-sulfuradas y los citocromos y, finalmente, al O_2. Echar un vistazo a los métodos utilizados en la determinación de la secuencia de actuación de los transportadores es instructivo, dado que se han utilizado aproximaciones similares en el estudio de otras cadenas de transferencia electrónica, tales como las que tienen lugar en cloroplastos.

En primer lugar se han determinado experimentalmente los potenciales de reducción estándar de los transportadores electrónicos individuales (Tabla 19–2). Es de esperar que los transportadores funcionen en orden de potenciales de reducción crecientes, porque los electrones tienden a fluir espontáneamente desde los transportadores de E'° más bajo hacia los transportadores con E'° más elevado. El orden de los transportadores deducido según este método es NADH → Q → citocromo *b* → citocromo c_1 → citocromo *c* → citocromo *a* → citocromo a_3 → O_2. Observe que el orden de los potenciales de reducción estándar no es necesariamente el mismo que el los potenciales de reducción reales en condiciones celulares, que dependen de las concentraciones de las

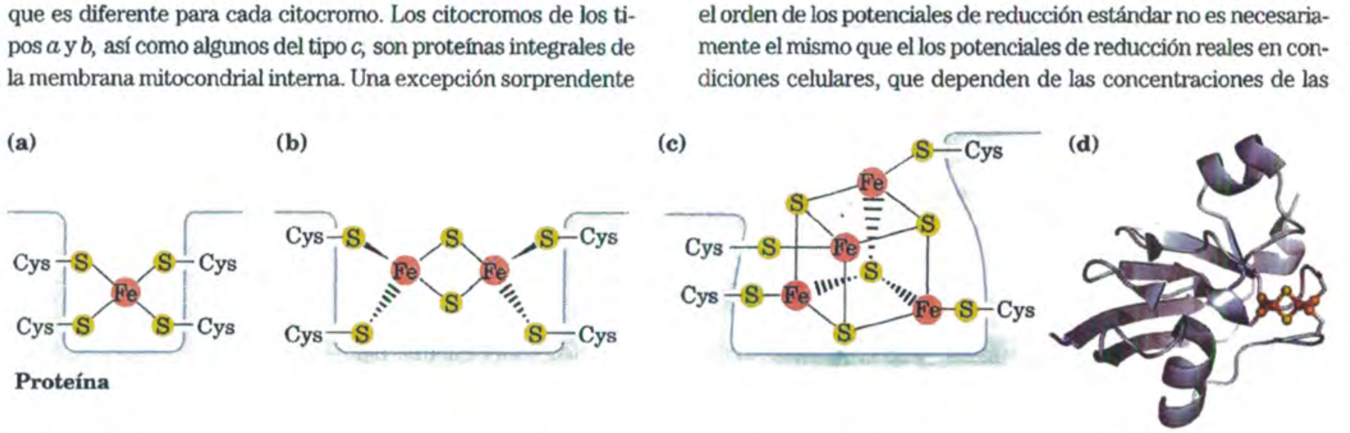


FIGURA 19–5 **Centros ferro-sulfurados.** Los centros Fe-S de las proteínas ferro-sulfuradas pueden ser tan sencillos como en **(a)**, con un solo ión Fe rodeado de átomos de S de cuatro residuos Cys. En otros centros hay átomos de S inorgánicos y orgánicos de la Cys, como en los centros 2Fe-2S **(b)** o 4Fe-4S **(c)**. La ferredoxina de la cianobacteria *Anabaena* 7120 **(d)** tiene un centro 2Fe-2S (PDB ID 1FRD); Fe en rojo, S inorgánico en amarillo y S de Cys en naranja. (Observe que en estas designaciones sólo se cuentan los átomos de S inorgánicos. Por ejemplo, en el centro 2Fe-2S **(b)**, cada ión Fe está, de hecho, rodeado por cuatro átomos de S.) El potencial de reducción estándar exacto del hierro en estos centros depende del tipo de centro y de los detalles de su interacción con la proteína asociada.

TABLA 19–2 Potenciales de reducción estándar de los transportadores electrónicos de la cadena respiratoria y relacionados

Reacción redox (media reacción)	E'° (V)
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$	−0,414
$NAD^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADH	−0,320
$NADP^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADPH	−0,324
NADH deshidrogenasa (FMN) + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADH deshidrogenasa ($FMNH_2$)	−0,30
Ubiquinona + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ ubiquinol	0,045
Citocromo *b* (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo *b* (Fe^{2+})	0,077
Citocromo c_1 (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo c_1 (Fe^{2+})	0,22
Citocromo *c* (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo *c* (Fe^{2+})	0,254
Citocromo *a* (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo *a* (Fe^{2+})	0,29
Citocromo a_3 (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo a_3 (Fe^{2+})	0,35
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$	0,8166

formas oxidadas y reducidas (véase la Ec. 13–5, p. 515). Un segundo método para determinar la secuencia de los transportadores electrónicos consiste en reducir la cadena de transportadores completa aportando una fuente de electrones en ausencia de un aceptor de electrones (sin O_2). Cuando se introduce O_2 en el sistema, la velocidad a la que se oxida cada transportador (determinada espectroscópicamente) muestra el orden en el que funcionan los transportadores. El transportador más próximo al O_2 (al final de la cadena) es el primero en ceder sus electrones, el segundo transportador desde el final es el siguiente en oxidarse, y así sucesivamente. Estos experimentos han confirmado la secuencia deducida a partir de los potenciales de reducción estándar.

En una confirmación final, se han utilizado agentes que inhiben el flujo de electrones a través de la cadena en combinación con medidas del grado de oxidación de cada transportador. En presencia de O_2 y un dador electrónico los transportadores que funcionan antes del paso inhibido quedan totalmente reducidos, mientras que los que funcionan después del bloqueo están completamente oxidados **(Fig. 19–6)**. Mediante la utilización de diversos inhibidores que bloquean diferentes puntos de la cadena se ha deducido la secuencia completa; es la misma que la predicha según los dos métodos anteriores.

Los transportadores de electrones actúan en complejos multienzimáticos

Los transportadores de electrones de la cadena respiratoria están organizados en complejos supramoleculares incrustados en membranas que se pueden separar físicamente. El tratamiento suave de la membrana mitocondrial interna con detergentes permite la resolución de cuatro complejos distintos de transportadores electrónicos, siendo cada uno de ellos capaz de catalizar la transferencia electrónica a través de una porción de la cadena (Tabla 19–3; **Fig. 19–7**). Los Complejos I y II catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona a partir de dos dadores electrónicos diferentes: NADH (Complejo I) y succinato (Complejo II). El Complejo III transporta electrones desde la ubiquinona reducida al citocromo *c*, y el Complejo IV completa la secuencia transfiriendo electrones desde el citocromo *c* al O_2.

Abordaremos a continuación con mayor detalle la estructura y la función de cada complejo de la cadena respiratoria mitocondrial.

Complejo I: NADH hasta ubiquinona La **Figura 19–8** muestra la relación entre los Complejos I y II y la ubiquinona. El **Complejo I,** también llamado **NADH:ubiquinona oxidorre-**

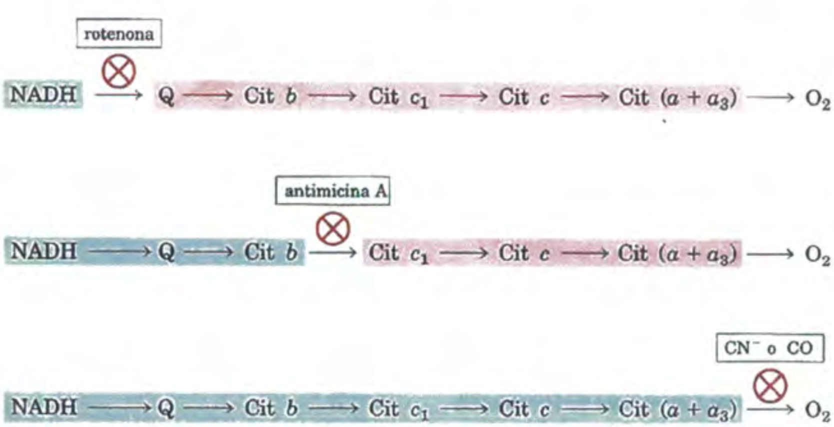


FIGURA 19–6 Método para determinar la secuencia de transportadores electrónicos. Este método mide el efecto de inhibidores de la transferencia electrónica sobre el estado de oxidación de cada transportador. En presencia de un dador electrónico y O_2, cada inhibidor da lugar a un patrón característico de transportadores oxidados/reducidos: los anteriores al bloqueo quedan reducidos (azul), mientras que los posteriores al bloqueo quedan oxidados (rojo).

TABLA 19–3 Componentes proteicos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

Complejo enzimático/proteína	Masa (kDa)	Número de subunidades*	Grupo(s) prostético(s)
I NADH deshidrogenasa	850	43 (14)	FMN, Fe-S
II Succinato deshidrogenasa	140	4	FAD, Fe-S
III Ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa	250	11	Hemos, Fe-S
Citocromo *c*†	13	1	Hemo
IV Citocromo oxidasa	160	13 (3–4)	Hemos; Cu_A, Cu_B

*Número de subunidades en los equivalentes bacterianos en paréntesis.

†Observe que el citocromo *c* no es parte de un complejo enzimático; se desplaza entre los Complejos III y IV como una proteína libremente soluble.

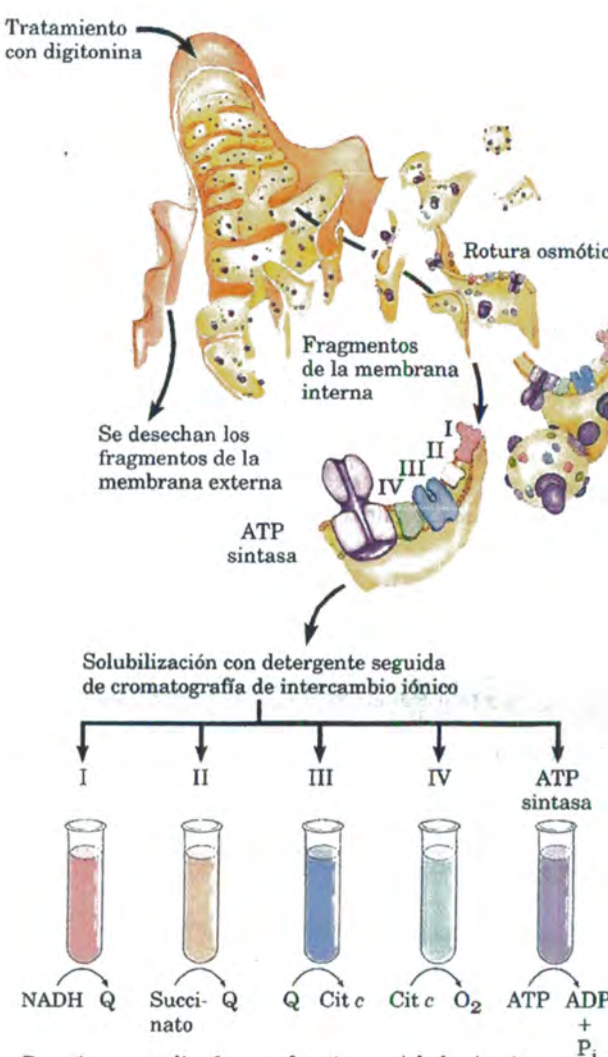


FIGURA 19–7 Resolución de los complejos funcionales de la cadena respiratoria. Se elimina primero la membrana mitocondrial externa por tratamiento con el detergente digitonina. A continuación se obtienen fragmentos de la membrana interna por rotura osmótica de la mitocondria, disolviéndose suavemente los fragmentos en un segundo detergente. La mezcla resultante de proteínas de la membrana interna se resuelve mediante cromatografía de intercambio iónico en varios complejos (I a IV) de la cadena respiratoria, cada uno con su composición proteica distintiva (véase la Tabla 19–3), y en el enzima ATP sintasa (a veces denominado Complejo V). Los Complejos I a IV aislados catalizan transferencias entre dadores (NADH y succinato), transportadores intermedios (Q y citocromo *c*) y O_2, tal como se muestra. In vitro, la ATP sintasa sólo tiene actividad hidrolizadora del ATP (ATPasa) y no sintetizadora de ATP.

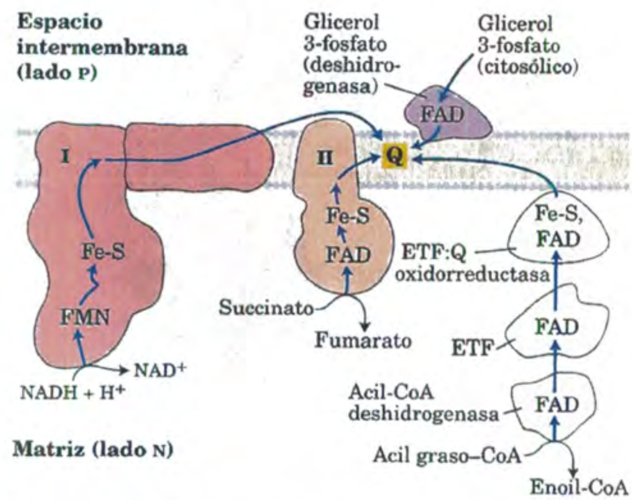


FIGURA 19–8 Ruta de los electrones desde el NADH, succinato, acil graso–CoA y glicerol 3-fosfato a la ubiquinona. Los electrones del NADH pasan a través de una flavoproteína a una serie de proteínas ferro-sulfuradas (en el Complejo I) y seguidamente a Q. Los electrones pasan desde el succinato a través de una flavoproteína y varios centros Fe-S (en el Complejo II) en su camino hacia Q. El glicerol 3-fosfato cede electrones a una flavoproteína (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) en la cara externa de la membrana mitocondrial interna desde la que pasan a Q. La acil–CoA deshidrogenasa (primer enzima de la β-oxidación) transfiere electrones a la flavoproteína transferidora de electrones (ETF), de la que pasan, vía ETF:ubiquinona oxidorreductasa, a Q.

ductasa o **NADH deshidrogenasa,** es un enzima enorme compuesto por 42 cadenas polipeptídicas diferentes, entre las que se encuentra una flavoproteína que contiene FMN y como mínimo seis centros ferro-sulfurados. La microscopia electrónica de alta resolución muestra que el Complejo I tiene forma de L, con un brazo de la L en la membrana y el otro prolongándose hacia la matriz. Tal como se muestra en la **Figura 19–9**, el Complejo I cataliza dos procesos simultáneos forzosamente acoplados: (1) la transferencia exergónica hacia la ubiquinona de un ión hidruro del NADH y un protón de la matriz expresado por:

$$NADH + H^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2 \qquad (19\text{–}1)$$

y (2) la transferencia endergónica de cuatro protones de la matriz hacia el espacio intermembrana. Por lo tanto, el Complejo I es una bomba de protones impulsada por la energía de la transferencia electrónica, y la reacción que cataliza es **vectorial:** mueve los protones en una dirección específica desde una localización (la matriz, que se carga negativamente con la

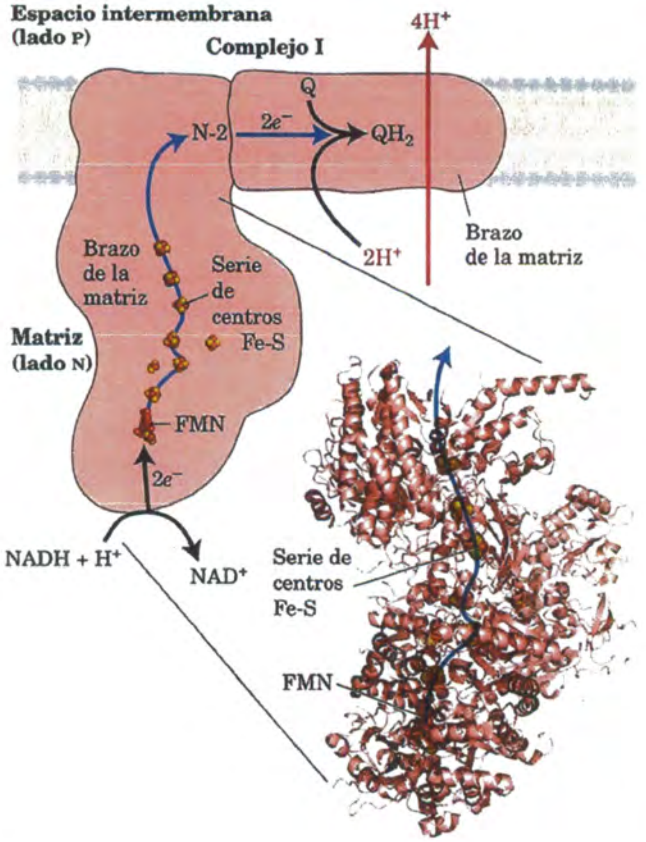


FIGURA 19–9 NADH:ubiquinona oxidorreductasa (Complejo I). El Complejo I cataliza la transferencia de un ión hidruro desde el NADH al FMN, a partir del cual pasan dos electrones a través de una serie de centros Fe-S a la proteína ferrosulfurada N-2 situada en el brazo del complejo orientado hacia la matriz. El dominio que se extiende hacia la matriz ha sido cristalizado y se ha resuelto su estructura (PDB ID 2FUG); no se conoce aún la estructura del dominio membranoso del Complejo I. La transferencia de electrones desde N-2 a la ubiquinona, que se encuentra en el brazo situado en la membrana, genera QH_2, el cual difunde por la bicapa lipídica. Esta transferencia de electrones también promueve la expulsión desde la matriz de cuatro protones por par de electrones. El mecanismo detallado por el que se acopla la transferencia de electrones y de protones en el Complejo I todavía no se conoce, pero es probable que intervenga un ciclo Q similar al que se da en el Complejo III, donde QH_2 participa dos veces por cada par de electrones (véase la Fig. 19–12). El flujo protónico provoca un potencial electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna (N lado negativo, P lado positivo), que conserva parte de la energía liberada por las reacciones de transferencia electrónica. Este potencial electroquímico impulsa la síntesis de ATP.

salida de los protones) hacia otra (el espacio intermembrana, que se carga positivamente). Para resaltar la naturaleza vectorial del proceso, la reacción global se expresa a menudo con subíndices que indican la localización de los protones: P para la cara positiva de la membrana interna (el espacio intermembrana) y N para la cara negativa (la matriz):

$$\text{NADH} + 5\text{H}_\text{N}^+ + \text{Q} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 + 4\text{H}_\text{P}^+ \quad (19\text{–}2)$$

El amital (un barbiturato), la rotenona (producto vegetal utilizado frecuentemente como insecticida) y el antibiótico piericidina A inhiben el flujo electrónico desde los centros Fe-S del Complejo I a la ubiquinona (Tabla 19–4), con el consecuente bloqueo global del proceso de la fosforilación oxidativa.

El ubiquinol (QH_2, la forma reducida; Fig. 19–2) difunde por la membrana mitocondrial interna desde el Complejo I al Complejo III, donde se oxida a Q en un proceso acompañado de la salida de H^+ hacia el exterior.

TABLA 19–4 Agentes que interfieren con la fosforilación oxidativa o con la fotofosforilación

Tipo de interferencia	Compuesto*	Diana/modo de acción
Inhibición de la transferencia electrónica	Cianuro CO	Inhibe la citocromo oxidasa
	Antimicina A	Bloquea la transferencia electrónica desde el citocromo b al c_1
	Mixotiazol Rotenona Amital Piericidina A	Impide la transferencia electrónica desde un centro Fe-S a la ubiquinona
	DCMU	Compite con Q_B por el sitio de unión en PSII
Inhibición de la ATP sintasa	Aurovertina	Inhibe F_1
	Oligomicina Venturicidina	Inhibe F_o y CF_o
	DCCD	Bloquea el flujo de protones a través de F_o y CF_o
Desacoplamiento de la fosforilación y el transporte electrónico	FCCP DNP	Transportadores protónicos hidrofóbicos
	Valinomicina	Ionóforo K^+
	Termogenina	Forma poros conductores de protones en la membrana interna de la mitocondria del tejido adiposo marrón
Inhibición del intercambio ATP-ADP	Atractilósido	Inhibe la nucleótido de adenina translocasa

*DCMU es 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea; DCCD, diciclohexilcarbodiimida; FCCP, cianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona; DNP, 2,4-dinitrofenol.

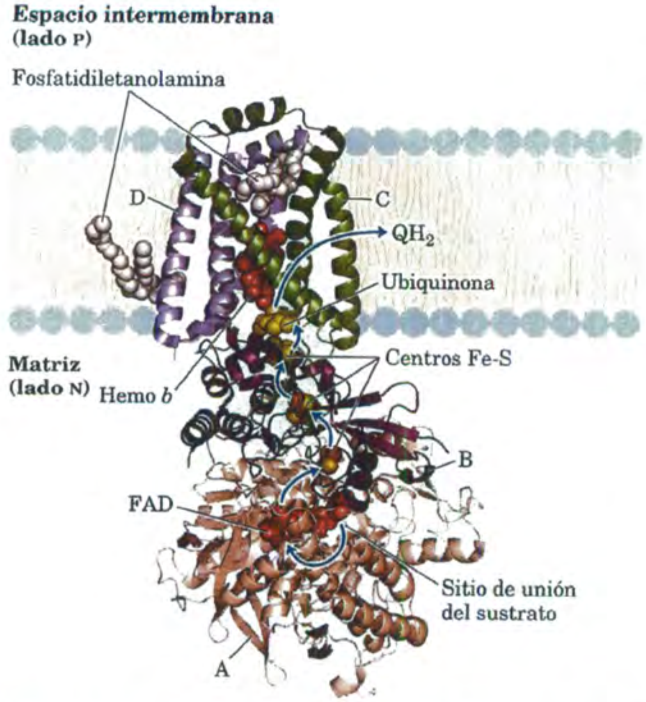


FIGURA 19–10 Estructura del Complejo II (succinato deshidrogenasa). (PDB ID 1ZOY). Este complejo (aquí se muestra el enzima de corazón porcino) tiene dos subunidades transmembrana, C y D; las extensiones citoplasmáticas contienen subunidades A y B. Inmediatamente detrás del FAD de la subunidad A se encuentra el sitio de unión del succinato. La subunidad B tiene tres conjuntos de centros Fe-S; la ubiquinona está unida a la subunidad B y el hemo *b* está entremedio de las subunidades C y D. Dos moléculas de fosfatidiletanolamina están unidas de manera tan fuerte a la subunidad D que se observa en la estructura cristalina. Los electrones se desplazan (flechas azules) desde el succinato al FAD, seguidamente a través de los tres centros Fe-S a la ubiquinona. El hemo *b* no se encuentra en la ruta principal de transferencia de los electrones pero protege contra la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS) por electrones que se desvían en el camino.

Complejo II: Succinato a ubiquinona En el Capítulo 16 encontramos el **Complejo II** bajo un nombre diferente: **succinato deshidrogenasa;** es el único enzima del ciclo del ácido cítrico ligado a membrana (p. 628). Aunque más pequeño y más sencillo que el Complejo I, contiene cinco grupos prostéticos de dos tipos y cuatro subunidades proteicas diferentes **(Fig. 19–10)**. Las subunidades C y D son proteínas integrales de membrana, cada una de ellas con tres hélices transmembrana. Contienen un grupo hemo (hemo *b*) y un sitio de unión para la ubiquinona, que es el aceptor final de electrones en la reacción catalizada por el Complejo II. Las subunidades A y B se extienden hacia la matriz; contienen tres centros 2Fe-2S, FAD unido y un sitio de unión para el sustrato succinato. La ruta de transferencia de electrones desde el sitio de unión del succinato al FAD, y a continuación a través de los centros Fe-S hasta al sitio de unión de Q, tiene más de 40 Å de longitud, si bien ninguna de las distancias de transferencia electrónica individuales excede unos 11 Å, una distancia razonable para una transferencia electrónica rápida (Fig. 19–10).

El hemo *b* del Complejo II no se encuentra, aparentemente, en la ruta directa de transferencia electrónica; en su lugar podría servir para reducir la frecuencia con la que los electrones "se pierden" fuera del sistema, desplazándose del succinato al oxígeno molecular para producir las **especies reactivas de oxígeno (ROS)** peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el **radical superóxido** ($\cdot O_2^-$), descritas más adelante. Los seres humanos con mutaciones puntuales en subunidades del Complejo II próximas al hemo *b* o al sitio de unión de quinona sufren paraganglioma hereditario. Esta enfermedad congénita se caracteriza por tumores benignos de la cabeza y cuello, normalmente en el cuerpo carotídeo, un órgano que mide los niveles de O_2 en la sangre. Estas mutaciones conducen a una mayor producción de ROS y quizás una mayor lesión tisular durante la oxidación del succinato. ■

Otros sustratos de las deshidrogenasas mitocondriales también pasan electrones a la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona, pero no a través del Complejo II. El primer paso en la β-oxidación de los acil graso–CoA, catalizado por la flavoproteína **acil-CoA deshidrogenasa** (véase la Fig. 17–8), implica la transferencia de electrones desde el sustrato al FAD de la deshidrogenasa y a continuación a la flavoproteína transferidora de electrones (ETF), que, a su vez, pasa sus electrones a la **ETF:ubiquinona oxidorreductasa** (Fig. 19–8). Este enzima pasa electrones a la cadena respiratoria al reducir la ubiquinona. El glicerol 3-fosfato, formado tanto a partir del glicerol liberado en la hidrólisis del triacilglicerol como de la reducción de la dihidroxiacetona fosfato en la glucólisis, es oxidado por **la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa** (véase la Fig. 17–4). Este enzima es una flavoproteína localizada en la cara externa de la membrana mitocondrial interna y, al igual que la succinato deshidrogenasa y la acil-CoA deshidrogenasa, canaliza electrones hacia la cadena respiratoria, reduciendo la ubiquinona (Fig. 19–8). En la Sección 19.2 se describe el importante papel de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa como lanzadera de equivalentes de reducción desde el NADH citosólico a la matriz mitocondrial (véase la Fig. 19–30). El efecto de cada uno de estos enzimas transferidores de electrones es contribuir a la reserva de ubiquinona reducida. El QH_2 formado en todas estas reacciones es reoxidado por el complejo III.

Complejo III: Ubiquinona a citocromo *c* El siguiente complejo respiratorio, el **Complejo III,** también denominado **complejo citocromo *bc*$_1$** o **ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa,** acopla la transferencia de electrones desde el ubiquinol (QH_2) al citocromo *c* con el transporte vectorial de protones de la matriz al espacio intermembrana. La determinación de la estructura completa de este gran complejo **(Fig. 19–11)** y de la del complejo IV (más adelante) por cristalografía de rayos X entre 1995 y 1998 marcaron un nuevo punto en el estudio de la transferencia de electrones mitocondrial, proporcionando el marco estructural para integrar las numerosas observaciones bioquímicas sobre la función de los complejos respiratorios.

La unidad funcional del Complejo III es un dímero con las dos unidades monoméricas del citocromo *b* rodeando una "caverna" en el centro de la membrana, en la que la ubiquinona tiene libertad para moverse desde el lado de la matriz de la membrana (sitio Q_N en un monómero) al espacio intermembrana (sitio Q_P del otro monómero) a medida que lanza electrones y protones a través de la membrana mitocondrial interna (Fig. 19–11b).

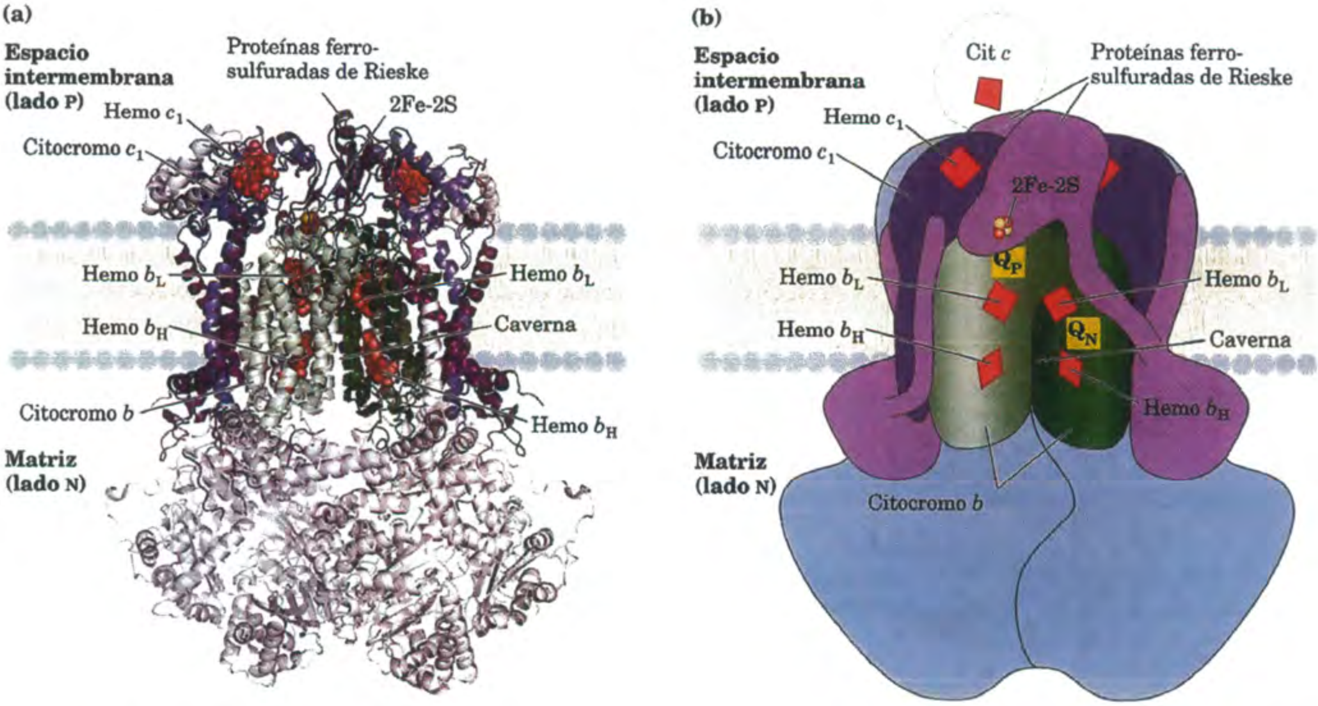


FIGURA 19–11 Complejo del citocromo bc_1 (Complejo III). El complejo es un dímero de monómeros idénticos, cada uno constituido por 11 subunidades diferentes. **(a)** El núcleo funcional de un monómero consta de tres subunidades: el citocromo b (en verde) con sus dos hemos (b_H y b_L); la proteína ferro-sulfurada de Rieske (púrpura) con sus dos centros 2Fe–2S, y el citocromo c_1 (en azul) con su hemo (PDB ID 1BGY). **(b)** En este esquema del complejo se muestra como el citocromo c_1 y la proteína ferro-sulfurada de Rieske se proyectan desde la superficie P, y pueden interaccionar con el citocromo c del espacio intermembrana (aunque no forma parte del complejo funcional). El complejo presenta dos sitios de unión diferenciados para la ubiquinona, Q_N y Q_P, que son los sitios de inhibición por dos fármacos que bloquean la fosforilación oxidativa. La antimicina A, que bloquea el flujo de electrones desde el hemo b_H a Q, se une a Q_N, cercano al hemo de b_H en el lado N (matriz) de la membrana. El mixotiazol, que impide el flujo de electrones desde QH_2 a la proteína ferro-sulfurada de Rieske, se une en Q_P, cercano al centro 2Fe-2S y al hemo b_L del lado P de la membrana. La estructura dimérica es esencial para la función del Complejo III. La interfase entre monómeros forma dos cavernas, cada una con un sitio Q_P de un monómero y otra con un sitio Q_N del otro. Los intermedios de la ubiquinona se mueven en el interior de estas cavernas protegidas.

El Complejo III cristaliza en dos conformaciones distintas (no mostradas). En una, el centro Fe-S de Rieske está cercano a su aceptor electrónico, el hemo del citocromo c_1, pero a relativa distancia del citocromo b y del sitio de unión de QH_2 en el que el centro Fe-S de Rieske recibe electrones. En la otra conformación, el centro Fe-S se ha desplazado del citocromo c_1 hacia el citocromo b. Se cree que la proteína de Rieske oscila entre estas dos conformaciones al ser primero reducida y a continuación oxidada.

Se ha propuesto un modelo razonable para el paso de electrones y protones a través del Complejo III a partir de su estructura y de detallados estudios bioquímicos de las reacciones redox, el **ciclo Q.** La ecuación neta de las reacciones redox del ciclo Q **(Fig. 19–12)** es

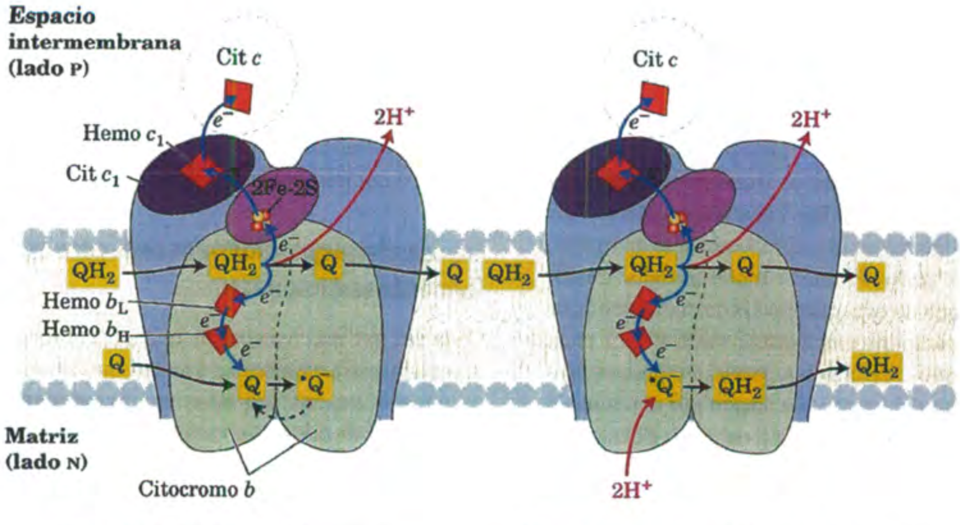
$$QH_2 + 2\ \text{cit}\ c_1\ (\text{oxidado}) + 2H^+_N \longrightarrow Q + 2\ \text{cit}\ c_1\ (\text{reducido}) + 4H^+_P \quad (19\text{–}3)$$

El ciclo Q adapta el cambio entre el transportador de dos electrones, la ubiquinona, y los transportadores de un electrón, los citocromos b_{562}, b_{566}, c_1 y c, y explica la estequiometría medida de cuatro protones translocados por cada par de electrones que pasan del Complejo III al citocromo c. Aunque la vía de los electrones por este segmento de la cadena respiratoria es complicada, el efecto neto de la transferencia es simple: QH_2 se oxida a Q, al tiempo que se reducen dos moléculas de citocromo c.

El citocromo c es una proteína soluble del espacio intermembrana. Después de que su único hemo acepte un electrón del Complejo III, el citocromo c se desplaza hacia el Complejo IV para ceder el electrón a un centro de cobre binuclear.

Complejo IV: Citocromo c a O_2 En el último paso de la cadena respiratoria, el **Complejo IV,** también llamado **citocromo oxidasa,** transporta electrones desde el citocromo c al oxígeno molecular, reduciéndolo a H_2O. El Complejo IV es un enzima muy grande (13 subunidades; M_r 204.000) de la membrana mitocondrial interna. Las bacterias poseen una forma mucho más sencilla con sólo tres o cuatro subunidades, pero que sigue siendo capaz de catalizar tanto la transferencia de electrones como el bombeo de protones. La comparación de los complejos mitocondrial y bacteriano sugiere que son esenciales tres subunidades para la función **(Fig. 19–13)**.

La subunidad II mitocondrial contiene dos iones Cu que forman complejo con los grupos —SH de dos residuos Cys en un centro binuclear (Cu_A; Fig. 19–13b) que se parece a los centros 2Fe-2S de las proteínas ferro-sulfuradas. La subunidad I



$$QH_2 + Q + \text{cit } c_1 \text{ (oxidado)} \longrightarrow {}^{\bullet}Q^- + Q + 2H_P^+ + \text{cit } c_1 \text{ (reducido)}$$

$$QH_2 + {}^{\bullet}Q^- + 2H_N^+ + \text{cit } c_1 \text{ (oxidado)} \longrightarrow QH_2 + 2H_P^+ + Q + \text{cit } c_1 \text{ (reducido)}$$

$$\text{Ecuación neta: } QH_2 + 2 \text{ cit } c_1 \text{ (oxidación)} + 2H_N^+ \longrightarrow Q + 2 \text{ cit } c_1 \text{ (reducido)} + 4H_P^+$$

FIGURA 19–12 El ciclo Q, mostrado en dos etapas. La ruta de los electrones a través del complejo III se muestra con flechas azules. En la primera etapa (izquierda) Q en el lado N se reduce al radical semiquinona, que en la segunda etapa (derecha) se convierte en QH_2. Mientras tanto, en el lado P de la membrana se oxidan dos moléculas de QH_2 a Q, liberando dos protones por Q (cuatro protones en total) en el espacio intermembrana. Cada QH_2 cede un electrón (vía el centro Fe-S de Rieske) al citocromo c_1, y un electrón (vía citocromo *b*) a una molécula de Q cerca del lado N, reduciéndolo en dos pasos a QH_2. Esta reducción también utiliza dos protones por Q, tomados de la matriz.

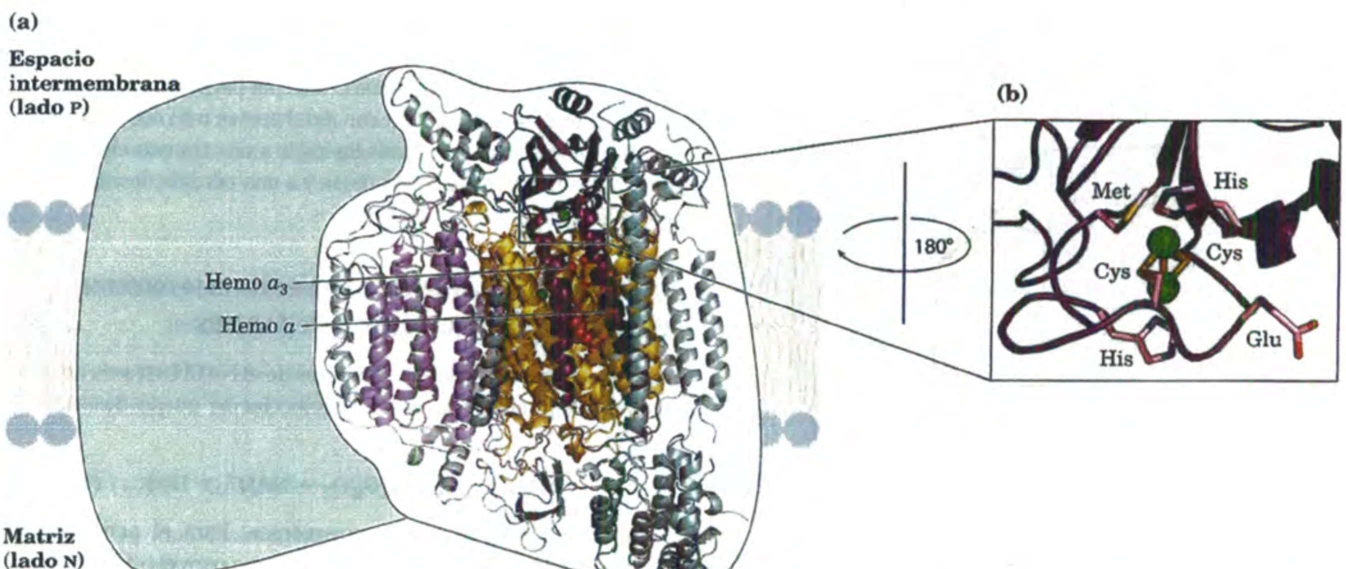


FIGURA 19–13 Estructura de la citocromo oxidasa (Complejo IV). Este complejo de mitocondrias bovinas tiene 13 subunidades, pero aquí sólo se muestran cuatro proteínas núcleo (PDB ID 1OCC). **(a)** Complejo IV con cuatro subunidades en cada una de dos unidades idénticas de un dímero. La subunidad I (en amarillo) tiene dos grupos hemo, *a* y a_3 cerca de un único ión cobre, Cu_B (esfera verde). El hemo a_3 y Cu_B forman un centro Fe-Cu binuclear. La subunidad II (púrpura) contiene dos iones Cu formando complejo con los grupos —SH de dos residuos Cys en un centro binuclear, Cu_A, que se parece a los centros 2Fe-2S de las proteínas ferro-sulfuradas. Este centro binuclear y el sitio de unión del citocromo *c* se localizan en un dominio de la subunidad II que sobresale desde el lado P de la membrana interna (hacia el espacio intermembrana). La subunidad III (en azul claro) es esencial para el movimiento rápido de protones a través de la subunidad II. La función de la subunidad IV (en verde) no se conoce aún. **(b)** El centro binuclear Cu_A. Los iones Cu comparten electrones de forma equitativa. Cuando el centro está reducido los iones tienen las cargas formales $Cu^{1+}Cu^{1+}$; en la forma oxidada, $Cu^{1.5+}Cu^{1.5+}$. Seis residuos aminoácidos son ligandos alrededor de los iones Cu: dos His, dos Cys, Glu y Met.

contiene dos grupos hemo, designados a y a_3, y otro ión cobre (Cu_B). El hemo a_3 y el Cu_B forman un segundo centro binuclear que acepta los electrones del hemo a y los transfiere al O_2 unido al hemo a_3.

La transferencia de electrones a través del complejo IV va del citocromo c al centro Cu_A, al hemo a, al centro hemo a_3–Cu_B y finalmente al O_2 **(Fig. 19–14)**. Por cada cuatro electrones que pasan a través del complejo, el enzima consume cuatro H^+ "sustrato" de la matriz (lado N), convirtiendo el O_2 en $2H_2O$. También utiliza la energía de esta reacción redox para bombear un protón hacia el espacio intermembrana (lado P) por cada electrón que pasa, añadiéndose al potencial electroquímico producido por el transporte del protón impulsado por el potencial redox a través del los Complejos I y III. La reacción global catalizada por el complejo IV es:

$$4\ \text{Cit}\ c\ \text{(reducido)} + 8H_N^+ + O_2 \longrightarrow 4\ \text{cit}\ c\ \text{(oxidado)} + 4H_P^+ + 2H_2O \quad (19\text{–}4)$$

En esta reducción del O_2 por cuatro electrones intervienen centros redox que transportan un único electrón al mismo tiempo, y se ha de dar sin la liberación de los intermedios incompletamente reducidos tales como el peróxido de hidrógeno o los radicales hidroxilo libres, especies muy reactivas que dañarían los componentes celulares. Los intermedios se mantienen fuertemente unidos al complejo hasta que se convierten completamente en agua.

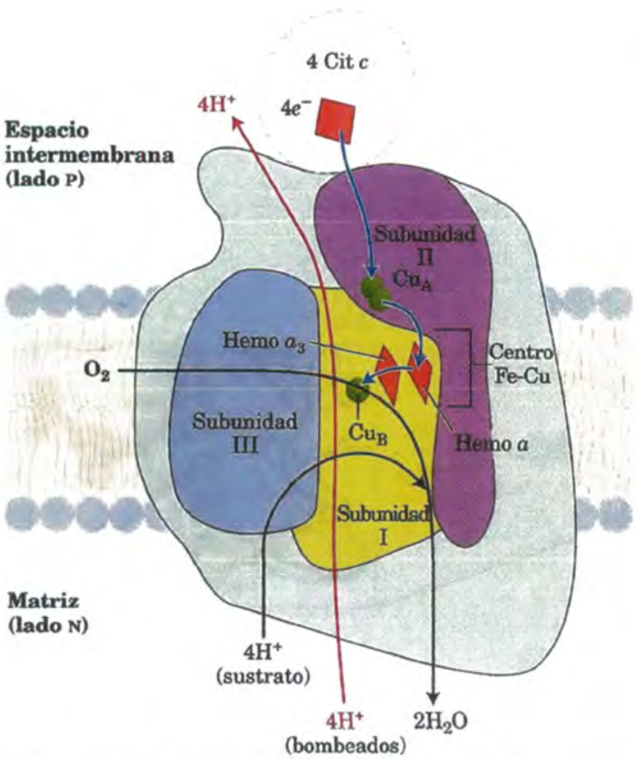


FIGURA 19–14 Paso de los electrones a través del Complejo IV. Tres proteínas esenciales en el flujo electrónico son las subunidades I, II y III. La estructura mayor incluye las 10 proteínas restantes del complejo. La transferencia electrónica a través del Complejo IV comienza con el citocromo c (parte superior). Dos moléculas de citocromo c reducidas donan un electrón cada una al centro binuclear Cu_A. A partir de aquí los electrones pasan a través del hemo a al centro Fe-Cu (citocromo a_3 y Cu_B). El oxígeno se une ahora al hemo a_3 y se reduce a su forma peroxi (O_2^{2-}; no mostrada aquí) gracias a dos electrones del centro Fe-Cu. La aportación de dos electrones adicionales del citocromo c (arriba, en total cuatro electrones) convierte el O_2^{2-} en dos moléculas de agua, consumiendo cuatro protones "sustrato" de la matriz. Simultáneamente se bombean cuatro protones más desde la matriz por un mecanismo todavía desconocido.

Los complejos mitocondriales se pueden asociar formando respirasomas

Cada vez hay más pruebas de que en la mitocondria intacta los complejos respiratorios se asocian fuertemente entre sí en la membrana interna y forman **respirasomas,** combinaciones funcionales de dos o más complejos de transferencia electrónica. Por ejemplo, cuando se extrae suavemente el Complejo III de las membranas mitocondriales, se encuentra asociado con el Complejo I y permanece asociado durante la electroforesis suave. También se pueden aislar supercomplejos de los Complejos III y IV que cuando se observan al microscopio electrónico tienen el tamaño y forma adecuados para acomodar las estructuras cristalinas de ambos complejos **(Fig. 19–15)**. La cinética del flujo electrónico a través de la serie de complejos respiratorios sería muy diferente en los dos casos extremos de asociación muy fuerte y de no asociación: (1) si los complejos estuviesen fuertemente unidos, las transferencias electrónicas tendrían lugar esencialmente a través de un estado sólido, y (2) si los complejos funcionasen separadamente, los electrones serían transportados entre ellos por la ubiquinona y el citocromo c. Las pruebas cinéticas apoyan la transferencia a través de un estado sólido y, por consiguiente, apoyan el modelo del respirasoma.

La cardiolipina, el lípido que es especialmente abundante en la membrana mitocondrial interna (véanse las Figs. 10–9 y 11–2), puede ser de importancia crítica para la integridad de los respirasomas; su eliminación con detergentes o su ausencia en ciertos mutantes de levaduras da lugar a una transferencia de electrones mitocondrial defectuosa y a una pérdida de afinidad entre los complejos respiratorios.

La energía de la transferencia de electrones se conserva eficientemente en un gradiente de protones

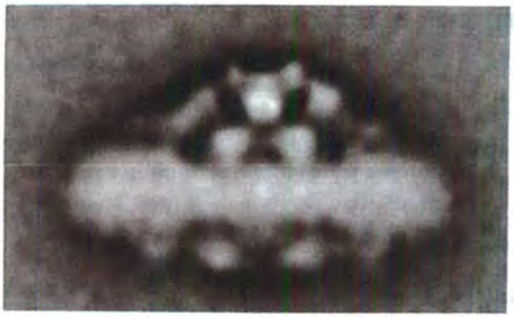
La transferencia de dos electrones desde el NADH a través de la cadena respiratoria al oxígeno molecular se puede describir como:

$$\text{NADH} + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + H_2O \qquad (19\text{–}5)$$

Esta reacción neta es muy exergónica. Para el par redox $NAD^+/NADH$, E'° es –0,320 V, mientras que para el par O_2/H_2O, E'° es 0,816 V. El $\Delta E'^\circ$ de esta reacción es, por tanto, 1,14 V, siendo la variación de energía libre estándar (véase la Ec. 13–7; p. 515)

$$\begin{aligned} \Delta G'^\circ &= -n\mathcal{F}\Delta E'^\circ \qquad (19\text{–}6)\\ &= -2(96{,}5\ \text{kJ/V}\cdot\text{mol})\,(1{,}14\ \text{V})\\ &= -220\ \text{kJ/mol (de NADH)}\end{aligned}$$

Esta variación de energía libre *estándar* se basa en la suposición de que las concentraciones de NADH y NAD^+ son iguales (1 M).



(a)

(b)

FIGURA 19–15 Un supuesto respirasoma compuesto por los Complejos III y IV. (a) Supercomplejos purificados que contienen los Complejos III y IV, de levadura, visualizados mediante microscopia electrónica después de tinción con acetato de uranilo. Se promediaron las densidades electrónicas de centenares de imágenes para obtener esta vista compuesta. **(b)** Las estructuras por rayos X de una molécula del Complejo III (rojo; de levadura) y dos del Complejo IV (verde; de corazón bovino) pudieron ajustarse al mapa de densidad electrónica, sugiriendo una manera posible de interacción de estos complejos en un respirasoma. Esta vista se encuentra en el plano de la bicapa (amarillo).

En las mitocondrias que respiran activamente, la acción de muchas deshidrogenasas mantiene el cociente [NADH]/[NAD^+] real muy por encima de la unidad, por lo que la variación real en la energía libre mostrado en la Ecuación 19–5 es mucho mayor (más negativo) que −220 kJ/mol. Un cálculo similar para la oxidación del succinato muestra que la transferencia de electrones desde el succinato (E'° para el fumarato/succinato = 0,031 V) al O_2 tiene una variación de energía libre estándar menor, aunque aún negativa, de unos −150 kJ/mol.

La mayor parte de esta energía se usa para bombear protones fuera de la matriz. Por cada par de electrones transferidos al O_2 se bombean cuatro protones por el Complejo I, cuatro por el Complejo III y dos por el Complejo IV **(Fig. 19–16)**. Por lo tanto, la ecuación *vectorial* del proceso es

$$NADH + 11H^+_N + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + 10H^+_P + H_2O \quad (19\text{–}7)$$

La energía electroquímica inherente en esta diferencia de concentración de protones y en la separación de cargas representa

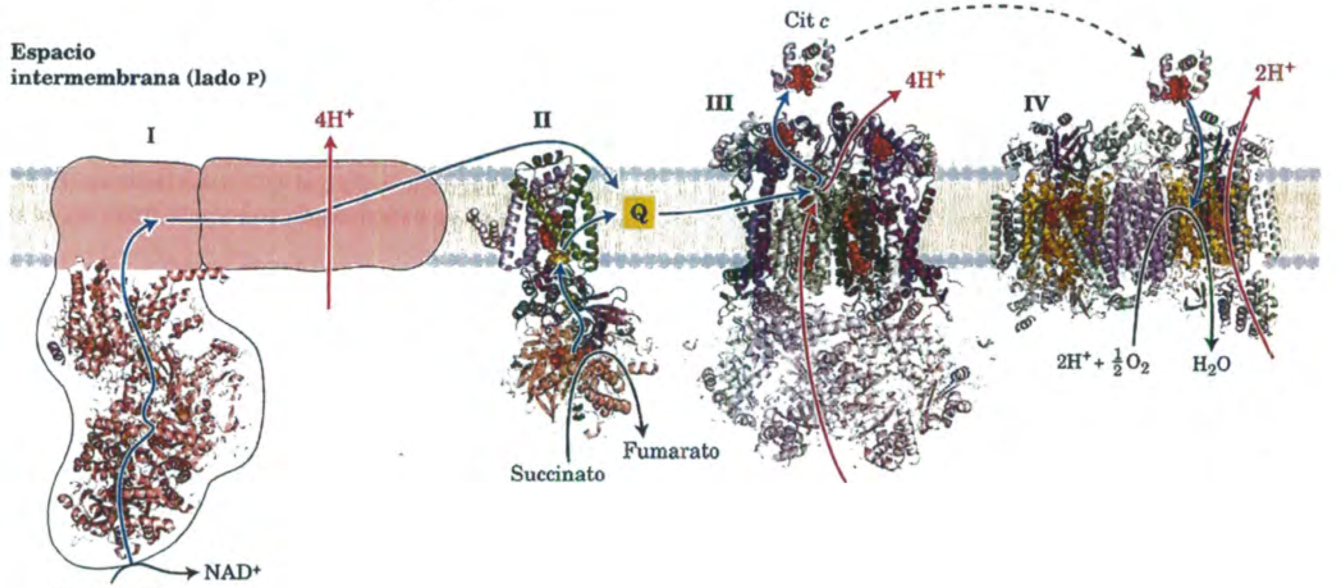
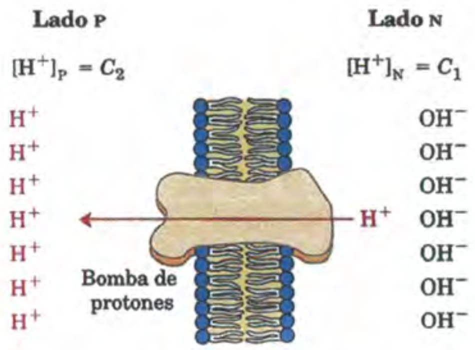


FIGURA 19–16 Resumen del flujo de electrones y protones a través de los cuatro complejos de la cadena respiratoria. Los electrones llegan a Q vía Complejos I y II. Q reducido (QH_2) actúa de transportador móvil de electrones y protones. Pasa electrones al Complejo III, el cual los pasa a otro eslabón de conexión móvil, el citocromo c. El Complejo IV transfiere electrones desde el citocromo c reducido al O_2. El flujo electrónico a través de los Complejos I, III y IV va acompañado del flujo de protones desde la matriz al espacio intermembrana. Recuerde que los electrones de la β-oxidación de los ácidos grasos también pueden entrar en la cadena respiratoria a través de Q (véase la Fig. 19–8). Las estructuras aquí mostradas son de diversas fuentes: el Complejo I de *Thermus thermophillus* (PDB ID 2FUG); el Complejo II de corazón porcino (PDB ID 1ZOY); el Complejo III, de corazón bovino (PDB ID 1BGY); el citocromo c de corazón equino (PDB ID 1HRC); el Complejo IV de corazón bovino (PDB ID 1OCC).



$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{J}\Delta\psi$$
$$= 2{,}3RT\,\Delta pH + \mathcal{J}\Delta\psi$$

FIGURA 19–17 Fuerza protón-motriz. La membrana mitocondrial interna separa dos compartimientos de diferente [H⁺], produciendo diferencias en la concentración química (ΔpH) y en la distribución de carga (Δψ) a través de la membrana. El efecto neto es la fuerza protón-motriz (ΔG) que se puede calcular en la forma indicada aquí. Todo ello se explica de manera más detallada en el texto.

una conservación temporal de la mayor parte de la energía de la transferencia electrónica. La energía almacenada en este tipo de gradiente, denominada **fuerza protón-motriz,** tiene dos componentes: (1) la *energía química potencial* debida a la diferencia en concentración de las especies químicas (H^+) entre las dos regiones separadas por la membrana, y (2) la *energía eléctrica potencial* que se origina con la separación de cargas cuando un protón atraviesa la membrana sin un contraión **(Fig. 19–17)**.

Tal como se mostró en el Capítulo 11, la variación en energía libre para la generación de un gradiente electroquímico por una bomba iónica es

$$\Delta G = RT \ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right) + Z\mathcal{J}\Delta\psi \qquad (19\text{–}8)$$

donde C_2 y C_1 son las concentraciones de un ión en dos regiones siendo $C_2 > C_1$; Z es el valor absoluto de su carga eléctrica (1 para un protón), y $\Delta\psi$ es la diferencia en potencial eléctrico transmembrana, medido en voltios.

Para protones a 25 °C,

$$\ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right) = 2{,}3(\log [H^+]_P - \log [H^+]_N)$$
$$= 2{,}3(pH_N - pH_P) = 2{,}3\ \Delta pH$$

y la Ecuación 19–8 se reduce a

$$\Delta G = 2{,}3RT\,\Delta pH + \mathcal{J}\Delta\psi \qquad (19\text{–}9)$$
$$= (5{,}70\ kJ/mol)\Delta pH + (96{,}5\ kJ/V\cdot mol)\Delta\psi$$

En las mitocondrias que respiran activamente, la $\Delta\psi$ medida es de 0,15 a 0,2 V y el pH de la matriz es unas 0,75 unidades más alcalino que el del espacio intermembrana.

EJEMPLO PRÁCTICO 19–1 Energética de la transferencia electrónica

Calcule la cantidad de energía conservada en el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna por par de electrones transferidos a través de la cadena respiratoria desde el NADH al oxígeno. Suponga que $\Delta\psi$ es 0,15 V y la diferencia de pH es 0,75 unidades.

Solución: La Ecuación 19–9 da la variación de energía libre estándar cuando se transporta *un* mol de protones a través de la membrana interna. Sustituyendo los valores medidos para ΔpH (0,75 unidades) y $\Delta\psi$ (0,15 V) en esta ecuación da ΔG = 19 kJ/mol (de protones). Debido a que la transferencia de dos electrones desde el NADH hasta el O_2 va acompañada del bombeo hacia fuera de 10 protones (Ec. 19–7), se conservan en el gradiente protónico unos 200 kJ de los 220 kJ liberados en la oxidación de 1 mol de NADH.

Cuando los protones fluyen espontáneamente *a favor* de su gradiente electroquímico, hay energía disponible para producir trabajo.

En mitocondrias, cloroplastos y bacterias aeróbicas, la energía electroquímica en el gradiente protónico impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. En la Sección 19.2 volveremos a la energética y estequiometría de la síntesis de ATP impulsada por el potencial electroquímico del gradiente protónico.

Durante la fosforilación oxidativa se producen especies de oxígeno reactivas

Diversos pasos en la ruta de reducción del oxígeno en la mitocondria tienen el potencial para producir radicales libres muy reactivos que pueden dañar las células. En el paso de electrones desde QH_2 al Complejo III y el paso de electrones desde el Complejo I a QH_2, interviene el radical $^{\bullet}Q^-$ como intermedio. El $^{\bullet}Q^-$ puede, con una probabilidad baja, pasar un electrón al O_2 en la reacción

$$O_2 + e^- \longrightarrow {}^{\bullet}O_2^-$$

El radical superóxido libre así generado, $^{\bullet}O_2^-$ es muy reactivo; su formación también conduce a la producción del radical hidroxilo libre, $^{\bullet}OH$, aún más reativo **(Fig. 19–18)**.

Estas especies de oxígeno reactivas pueden causar estragos reaccionando y dañar enzimas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos. En mitocondrias que respiran activamente, desde un 0,1% y hasta un 4% del O_2 usado en la respiración forma $^{\bullet}O_2^-$, más de lo suficiente para tener efectos letales sobre una célula a menos que se elimine rápidamente el radical libre. Los factores que enlentecen el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria aumentan la formación de superóxido, quizá porque prolongan el tiempo de vida del $^{\bullet}O_2^-$ generado en el ciclo Q.

Para impedir el daño oxidativo por $^{\bullet}O_2^-$, las células tienen varias formas del enzima **superóxido dismutasa,** que cataliza la reacción

$$2\,{}^{\bullet}O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

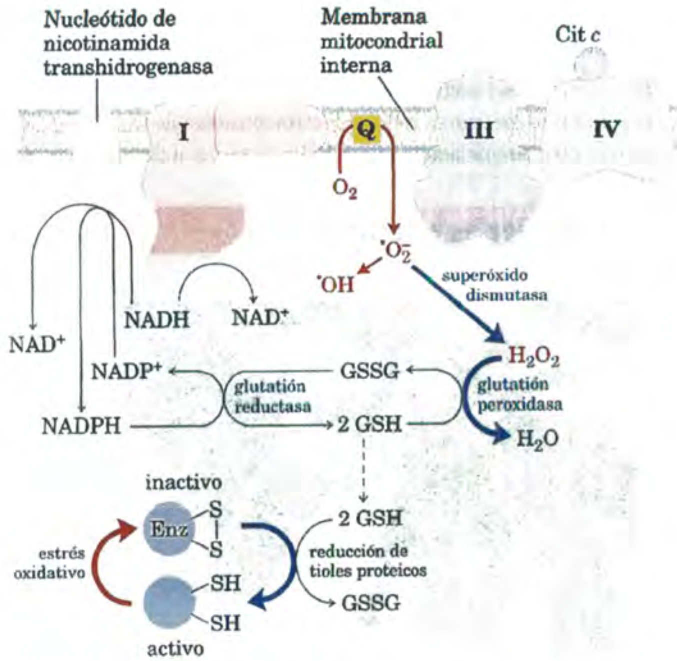


FIGURA 19–18 Formación de ROS en mitocondrias y defensas mitocondriales. Cuando la velocidad de entrada de electrones en la cadena respiratoria y la velocidad de transferencia de electrones a través de la cadena no está ajustadas, aumenta la formación de radical superóxido ($\cdot O_2^-$) en los Complejos I y III, a medida que el radical ubiquinona parcialmente reducido ($\cdot Q^-$) cede un electrón al O_2. El superóxido actúa sobre la aconitasa, una proteína 4Fe-4S, liberando Fe^{2+}. En presencia de Fe^{2+}, la reacción de Fenton conduce a la formación del radical hidroxilo ($\cdot OH$) libre muy reactivo. Las reacciones mostradas en azul defienden la célula frente a los efectos lesivos del superóxido. El glutatión reducido (GSH; véase la Fig. 22–27) cede electrones para la reducción del H_2O_2 y de residuos Cys oxidados (—S—S—) en enzimas y otras proteínas, y el GSH se regenera a partir de la forma oxidada (GSSG) por reducción con NADPH.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) así generado se vuelve inocuo por acción de la **glutatión peroxidasa** (Fig. 19–18). La glutatión reductasa recicla el glutatión oxidado a su forma reducida, utilizando electrones del NADPH formado por la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (en la mitocondria) o por la vía de las pentosas fosfato (en el citosol; véase la Fig. 14–20). El glutatión reducido también sirve para mantener los grupos sulfhidrilo de la proteína en su estado reducido, impidiendo algunos de los efectos deletéreos del estrés oxidativo (Fig. 19–18). La nicotinamida nucleótido transhidrogenasa es de gran importancia en este proceso: produce el NADPH esencial para la actividad de la glutatión reductasa.

Las mitocondrias de plantas tienen mecanismos alternativos para oxidar el NADH

Las mitocondrias de plantas proporcionan a la célula ATP durante períodos de poca iluminación o en la oscuridad, mediante mecanismos completamente análogos a los utilizados por los organismos no fotosintéticos. En presencia de luz, la fuente principal de NADH mitocondrial es una reacción en la que la glicina generada en un proceso denominado fotorrespiración se convierte en serina (véase la Fig. 20–21):

$$2\ \text{Glicina} + NAD^+ \longrightarrow \text{serina} + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+$$

Debido a las razones discutidas en el Capítulo 20, las plantas han de realizar esta reacción incluso cuando no necesitan NADH para producir ATP. Para regenerar NAD^+ a partir del NADH que no se necesita, las mitocondrias de plantas transfieren electrones directamente desde el NADH hasta la ubiquinona, y desde la ubiquinona directamente al O_2, sin pasar por los Complejos III y IV y sus bombas protónicas. En este proceso la energía que contenía el NADH se disipa en forma de calor, lo cual en algunos casos es útil para la planta (Recuadro 19–1). A diferencia de la citocromo oxidasa (Complejo IV), la QH_2 oxidasa no se inhibe por cianuro. La oxidación del NADH resistente al cianuro es, por lo tanto, la característica principal de esta vía de transferencia electrónica única en plantas.

RESUMEN 19.1 Reacciones de transferencia de electrones en las mitocondrias

- La teoría quimiosmótica proporciona el marco intelectual para comprender muchas transducciones biológicas de energía, entre ellas la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación. El mecanismo de acoplamiento de la energía es similar en ambos casos: la energía del flujo de electrones se conserva mediante el bombeo concomitante de protones a través de la membrana, lo que produce un gradiente electroquímico, la fuerza protón-motriz.
- En la mitocondria, iones hidruro eliminados de sus sustratos por la acción de deshidrogenasas ligadas al NAD ceden sus electrones a la cadena respiratoria (de transferencia electrónica), que los transfiere al O_2 molecular reduciéndolo a H_2O.
- Los sistemas de lanzadera transportan equivalentes de reducción desde el NADH citosólico al NADH mitocondrial. Los equivalentes de reducción de todas las deshidrogenaciones ligadas al NAD son transferidos a la NADH deshidrogenasa mitocondrial (Complejo I).
- Los equivalentes de reducción pasan seguidamente a través de una serie de centros Fe-S a la ubiquinona, que transfiere los electrones al citocromo *b*, primer transportador del Complejo III. En este complejo los electrones pasan por dos caminos diferentes a través de dos citocromos de tipo *b* y el citocromo c_1 a un centro Fe-S. El centro Fe-S pasa electrones, de uno en uno, a través del citocromo *c*, al Complejo IV, la citocromo oxidasa. Este enzima, que contiene cobre y que también contiene citocromos a y a_3, acumula electrones pasándolos después al O_2 y reduciéndolo a H_2O.
- Algunos electrones entran en esta cadena de transportadores por rutas alternativas. El succinato es oxidado por la succinato deshidrogenasa (Complejo II) que contiene una flavoproteína que pasa los electrones a través de varios centros Fe-S a la ubiquinona. Los electrones procedentes

de la oxidación de ácidos grasos pasan a la ubiquinona vía la flavoproteína transferidora de electrones.

- Las especies de oxígeno reactivas, que son potencialmente muy dañinas, producidas en la mitocondria se inactivan gracias a un conjunto de enzimas protectores, entre los que se cuentan la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa.
- Las plantas, los hongos y los eucariotas unicelulares tienen la ruta típica de transferencia electrónica sensible al cianuro y otra de oxidación del NADH resistente al cianuro.

RECUADRO 19–1 Calor, plantas malolientes y rutas respiratorias alternativas

Muchas plantas con flores atraen insectos polinizadores liberando moléculas olorosas que mimetizan las fuentes de alimentación naturales de los insectos o los sitios potenciales para la puesta de los huevos. Las plantas polinizadas por moscas o escarabajos, que normalmente se alimentan o hacen la puesta de los huevos en estiércol o en carroña, utilizan a veces compuestos malolientes para atraerlos.

Una de las familias de plantas malolientes es la de las Aráceas, que incluye filodendros, un tipo de lirios y las coles mofeta. Estas plantas tienen flores pequeñas agrupadas densamente en una estructura erecta (espádice) y están rodeadas por una hoja modificada (espata). Aquella libera olor a carne podrida o estiércol. Antes de la polinización, la espádice se calienta, en algunas especies hasta 20–40 °C por encima de la temperatura ambiente. La producción de calor (termogénesis) ayuda a evaporar las moléculas olorosas para que se dispersen mejor, y debido a que tanto la carne podrida como el estiércol están generalmente calientes como consecuencia del metabolismo hiperactivo de los microorganismos carroñeros, el calor por sí mismo también podría atraer a los insectos. En el caso de la col mofeta oriental (Fig. 1), que florece al final del invierno o al principio de la primavera cuando la nieve todavía cubre el suelo, la termogénesis permite que la espádice crezca a través de la nieve.

FIGURA 1 Col mofeta oriental

¿Cómo calienta una col mofeta oriental su espádice? Aunque las mitocondrias de plantas, hongos y eucariotas unicelulares tienen sistemas de transferencia de electrones que son básicamente los mismos que los de animales, también tienen una vía respiratoria alternativa. En esta vía, una QH_2 oxidasa resistente al cianuro transfiere directamente los electrones desde la reserva de ubiquinona al oxígeno, evitando los dos pasos de translocación de protones de los Complejos III y IV (Fig. 2). La energía que se podría haber conservado en forma de ATP se libera, en cambio, en forma de calor. Las mitocondrias de plantas también tienen una NADH deshidrogenasa alternativa, insensible a la rotenona, inhibidor del Complejo I (véase la Tabla 19–4), que transfiere electrones desde el NADH de la matriz directamente a la ubiquinona, sin utilizar el Complejo I ni el bombeo protónico asociado. Las mitocondrias de plantas tienen además otra NADH deshidrogenasa, en la cara externa de la membrana interna, que transfiere electrones desde el NADPH o NADH del espacio intermembrana a la ubiquinona, igualmente sin utilizar el Complejo I. De este modo, cuando los electrones pasan por la vía respiratoria alternativa gracias a la NADH deshidrogenasa insensible a la rotenona, a la NADH deshidrogenasa externa o a la succinato deshidrogenasa (Complejo II) y pasan al O_2 vía la oxidasa alternativa resistente al cianuro, la energía no se conserva como ATP, sino que se libera en forma de calor. Una col mofeta puede utilizar el calor para fundir la nieve, producir mal olor o atraer escarabajos y moscas.

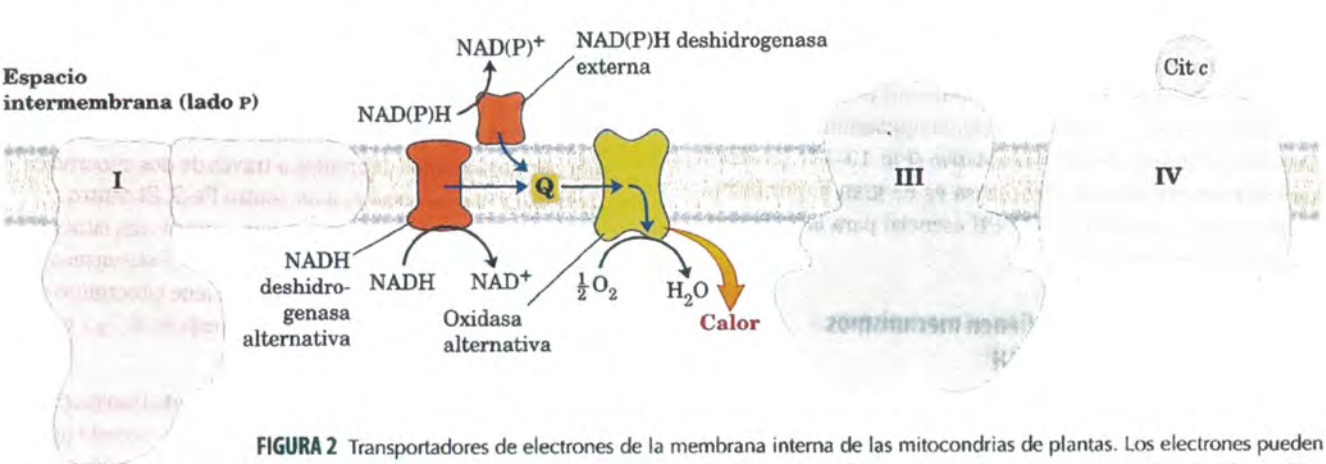


FIGURA 2 Transportadores de electrones de la membrana interna de las mitocondrias de plantas. Los electrones pueden fluir a través de los Complejos I, III y IV, al igual que en las mitocondrias de animales, o a través de transportadores alternativos específicos de plantas mediante las vías mostradas con flechas azules.

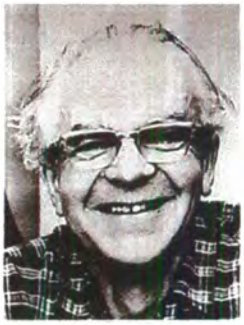
19.2 Síntesis de ATP

¿Cómo se transforma un gradiente de concentración de protones en ATP? Hemos visto que la transferencia electrónica libera, y la fuerza protón-motriz conserva, energía más que suficiente (unos 200 kJ) por "mol" de par de electrones para impulsar la formación de un mol de ATP, que requiere aproximadamente 50 kJ (p. 503). La fosforilación oxidativa mitocondrial no plantea, por lo tanto, ningún problema termodinámico. Sin embargo, ¿qué mecanismo químico acopla el flujo de protones con la fosforilación?

El **modelo quimiosmótico** propuesto por Peter Mitchell es el paradigma de este mecanismo. Según dicho modelo **(Fig. 19–19)**, la energía electroquímica inherente a la diferencia en la concentración de protones y a la separación de cargas a través de la membrana mitocondrial interna (la fuerza protón-motriz) impulsa la síntesis de ATP a medida que los protones fluyen de manera pasiva de vuelta hacia la matriz a través de un poro asociado a la **ATP sintasa.** Para resaltar el papel crucial de la fuerza protón-motriz, la ecuación de la síntesis de ATP se escribe algunas veces como

$$\mathrm{ADP} + \mathrm{P_i} + n\mathrm{H_P^+} \longrightarrow \mathrm{ATP} + \mathrm{H_2O} + n\mathrm{H_N^+} \quad (19\text{–}10)$$

Mitchell utilizó el término "quimiosmótico" para describir las reacciones enzimáticas en las que intervienen, simultáneamente, una reacción química y un proceso de transporte. En la **Figura 19–20** se muestra la definición operativa de "acoplamiento". Cuando se suspenden mitocondrias aisladas en un tampón que contiene ADP, P_i y un sustrato oxidable tal como el succinato, tienen lugar tres procesos que pueden medirse fácilmente: (1) se oxida el sustrato (el succinato da fumarato), (2) se consume O_2 y (3) se sintetiza ATP. El consumo de oxígeno y la síntesis de ATP dependen de la presencia de un sustrato oxidable (en este caso el succinato), así como de ADP y P_i.



Peter Mitchell, 1920–1992

Debido a que la energía de la oxidación del sustrato impulsa la síntesis de ATP en la mitocondria, es de esperar que los inhibidores del paso de electrones al O_2 (por ejemplo, el cianuro, el monóxido de carbono y la antimicina A) bloqueen la síntesis de ATP (Fig. 19–20a). Más sorprendente es el descubrimiento de que lo contrario también se cumple: la inhibición de la síntesis de ATP bloquea la transferencia electrónica en mitocondrias intactas. Este acoplamiento obligatorio se puede demostrar en mitocondrias aisladas proporcionándoles O_2 y sustratos oxidables pero no ADP (Fig. 19–20b). En estas condiciones no puede haber síntesis de ATP y no se da la transferencia electrónica al O_2. El acoplamiento entre la oxidación y la fosforilación también puede demostrarse usando oligomicina o venturicidina, antibióticos tóxicos que se unen a la ATP sintasa de la mitocondria. Estos compuestos son inhibidores potentes de la síntesis de ATP *y* de la transferencia electrónica a través de la cadena de transportadores al O_2 (Fig. 19–20b). Dado que se sabe que la oligomicina no interacciona directamente con los transportadores electrónicos sino sólo con la ATP sintasa, se desprende que la transferencia de electrones y la síntesis de ATP están obligatoriamente acopladas; una reacción no tiene lugar sin la otra.

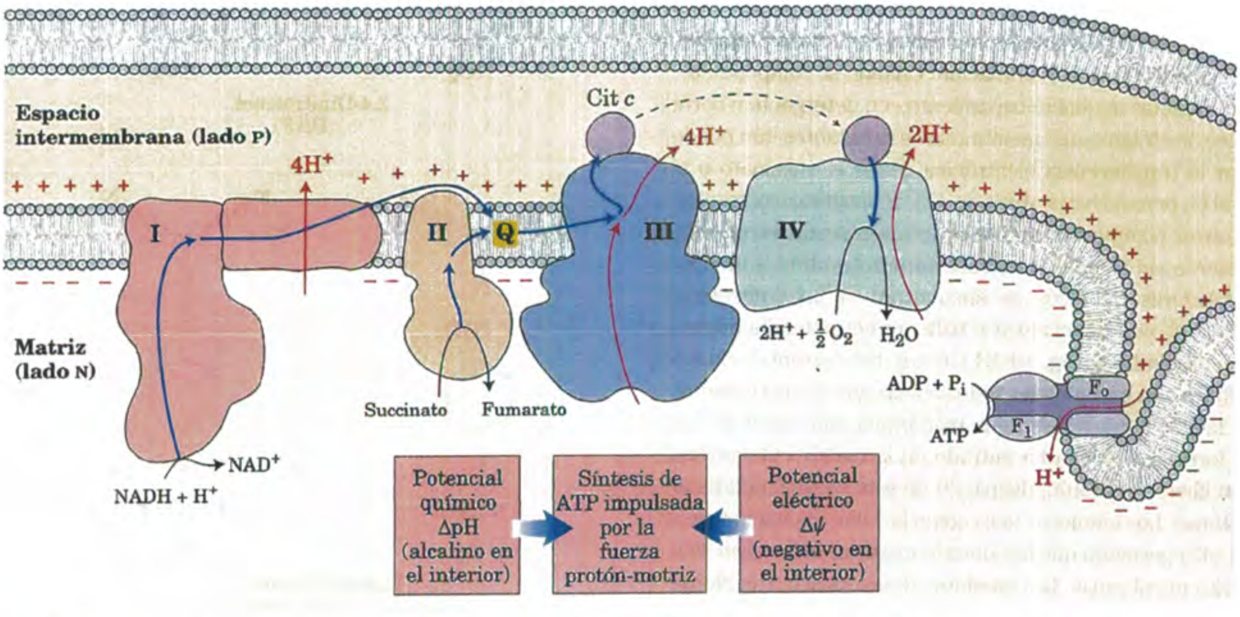


FIGURA 19–19 Modelo quimiosmótico. En esta representación sencilla de la teoría quimiosmótica aplicada a la mitocondria, los electrones del NADH y otros sustratos oxidables pasan a través de una cadena de transportadores distribuidos asimétricamente en la membrana interna. El flujo electrónico está acompañado de transferencia de protones a través de la membrana, que producen un gradiente químico (ΔpH) y un gradiente eléctrico (Δψ). La membrana mitocondrial interna es impermeable a los protones; los protones sólo pueden volver a penetrar en la matriz a través de canales específicos de protones (F_o). La fuerza protón-motriz que impulsa el retorno de los protones a la matriz proporciona la energía para la síntesis de ATP catalizada por el complejo F_1 asociado con F_o.

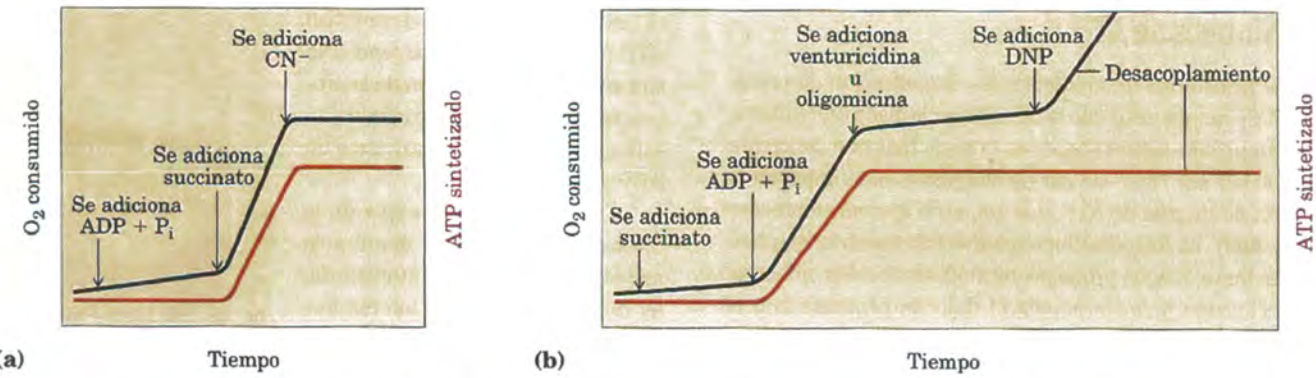
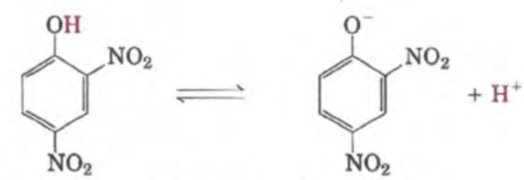


FIGURA 19–20 Acoplamiento de la transferencia electrónica con la síntesis de ATP en la mitocondria. En experimentos para demostrar el acoplamiento, se suspenden las mitocondrias en un medio tamponado utilizándose un electrodo de O_2 para seguir el consumo de O_2. A intervalos se toman muestras que se analizan para ver la presencia de ATP. **(a)** La adición de ADP y P_i solos no da lugar a ningún incremento, o muy poco, de la respiración (consumo de O_2; negro) o síntesis de ATP (rojo). Cuando se añade succinato, empieza inmediatamente la respiración y se sintetiza ATP. La adición de cianuro (CN^-), que bloquea la transferencia de electrones entre la citocromo oxidasa (Complejo IV) y el O_2, inhibe tanto la respiración como la síntesis de ATP. **(b)** Las mitocondrias que contienen succinato sólo respiran y sintetizan ATP cuando se añaden ADP y P_i. La adición posterior de venturicidina u oligomicina, inhibidores de la ATP sintasa, bloquea tanto la síntesis de ATP como la respiración. El dinitrofenol (DNP) actúa como desacoplante, ya que permite que continúe la respiración sin síntesis de ATP.

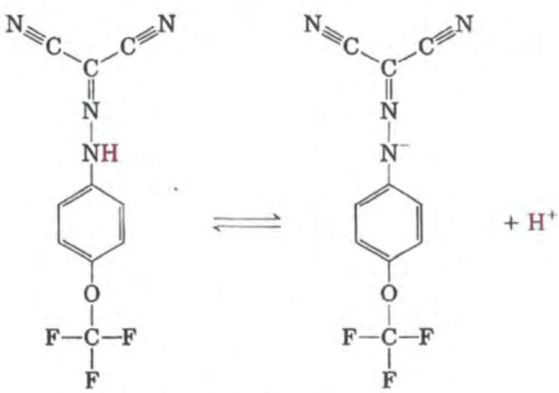
La teoría quimiosmótica explica fácilmente la dependencia de la transferencia electrónica de la síntesis de ATP en la mitocondria. Cuando se bloquea el flujo de protones hacia la matriz a través del canal de la ATP sintasa (por ejemplo con oligomicina), no hay una vía de retorno de los protones a la matriz, y su salida continua impulsada por la actividad de la cadena respiratoria genera un gran gradiente de protones. La fuerza protón-motriz va aumentando hasta que el coste (energía libre) del bombeo de protones fuera de la matriz en contra de este gradiente es igual o superior a la energía liberada por la transferencia de electrones desde el NADH al H_2O. Llegado este punto, el flujo de electrones ha de parar; la energía libre del proceso global del flujo de electrones acoplado al bombeo de protones es cero y se alcanza el equilibrio.

Hay, no obstante, ciertas condiciones y reactivos que desacoplan la oxidación y la fosforilación. Cuando se rompen mitocondrias intactas mediante tratamiento con detergente o corte mecánico, los fragmentos membranosos resultantes aún puede catalizar la transferencia electrónica desde el succinato o el NADH al O_2 pero no hay síntesis de ATP acoplada a esta respiración. Ciertos compuestos químicos, también producen el desacoplamiento sin romper la estructura mitocondrial. Entre los desacopladores químicos se encuentran el 2,4-dinitrofenol (DNP) y el carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (Tabla 19–4; **Fig. 19–21**). Estos desacoplantes son ácidos débiles con propiedades hidrofóbicas que les permiten difundir fácilmente a través de la membrana mitocondrial. Una vez la forma protonada ha entrado en la matriz mitocondrial pueden liberar el protón, disipando de este modo el gradiente de protones. Los ionóforos tales como la valinomicina (véase la Fig. 11–45) permiten que los iones inorgánicos atraviesen fácilmente las membranas. Los ionóforos desacoplan la transferencia de electrones de la fosforilación oxidativa, disipando a través de la membrana mitocondrial la contribución eléctrica en el gradiente electroquímico.

Una predicción de la teoría quimiosmótica es que, dado que el papel de la transferencia de electrones en la síntesis mitocondrial de ATP es simplemente bombear protones para crear el potencial electroquímico de la fuerza protón-motriz, un gradiente de protones creado artificialmente debería poder reemplazar la transferencia de electrones como impulsor de la síntesis de ATP. La predicción se ha confirmado experimentalmente **(Fig. 19–22)**. Las mitocondrias manipuladas de modo que se cree una diferencia en concentración de protones y una separación de cargas a través de la membrana interna sintetizan ATP *en ausencia de un sustrato oxidable*; la fuerza protón-motriz es por sí sola suficiente para impulsar la síntesis de ATP.



2,4-Dinitrofenol
(DNP)



Carbonilcianuro-
p-trifluorometoxifenilhidrazona
(FCCP)

FIGURA 19–21 Dos desacoplantes químicos de la fosforilación oxidativa. DNP y FCCP contienen un protón disociable y son muy hidrofóbicos. Transportan protones a través de la membrana mitocondrial interna disipando el gradiente de protones. Ambos desacoplan la fotofosforilación (véase la Fig. 19–63).

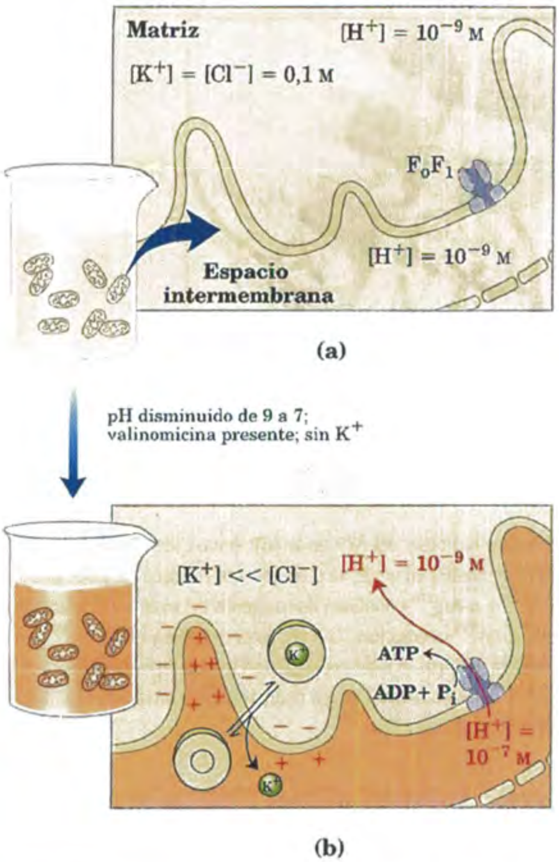


FIGURA 19–22 Demostración del papel de un gradiente de protones en la síntesis de ATP. Un gradiente electroquímico impuesto artificialmente puede impulsar la síntesis de ATP en ausencia de un sustrato oxidable como dador electrónico. En este experimento en dos pasos, **(a)** se incuban primeramente mitocondrias aisladas en un tampón a pH 9 que contienen KCl 0,1 M. La lenta entrada de tampón y KCl a la mitocondria hace que finalmente la matriz se encuentre en equilibrio con el medio circundante. No se encuentran presentes sustratos oxidables. **(b)** Las mitocondrias se separan ahora del tampón de pH 9 y se resuspenden en tampón de pH 7 que contiene valinomicina pero no KCl. El cambio de tampón crea una diferencia de dos unidades de pH a través de la membrana interna de la mitocondria. El flujo de K^+ hacia el exterior, llevado a cabo (por la valinomicina) a favor de su concentración de gradiente pero sin un contraión, crea un desequilibrio de carga a través de la membrana (matriz negativa). La suma del potencial químico proporcionado por la diferencia de pH y el potencial eléctrico debido a la separación de cargas constituye una fuerza protón-motriz suficientemente grande para permitir la síntesis de ATP en ausencia de un sustrato oxidable.

La ATP sintasa tiene dos dominios funcionales, F_o y F_1

La ATP sintasa mitocondrial es una ATPasa de tipo F (véase la Fig. 11–39), similar en estructura y mecanismo a las ATP sintasas de cloroplastos y bacterias. Este gran complejo enzimático de la membrana mitocondrial interna cataliza la formación de ATP a partir de ADP y P_i, acompañado por el flujo de protones desde el lado P al N de la membrana (Ec. 19–10). La ATP sintasa, también denominada Complejo V, tiene dos componentes distintos: F_1, una proteína periférica de membrana, y F_o, que es una proteína integral de membrana. La letra del subíndice *o* en F_o indica que es sensible a la oligomicina. F_1, primer factor identificado como necesario para la fosforilación oxidativa, fue identificado y purificado por Efraim Racker y colaboradores a principios de la década de 1960.

Efraim Racker, 1913–1991

En el laboratorio, las pequeñas vesículas de membranas formadas a partir de la membrana mitocondrial interna llevan a cabo la síntesis de ATP acoplada a la transferencia electrónica. Cuando se extrae cuidadosamente la F_1, las vesículas "desnudas" aún contienen cadenas respiratorias intactas y la porción F_o de la ATP sintasa. Las vesículas pueden catalizar la transferencia de electrones del NADH al O_2, pero no producen un gradiente de protones: F_o tiene un poro protónico a través del cual los protones se escapan tan rápidamente como son bombeados por la transferencia electrónica, y sin un gradiente de protones las vesículas que carecen de F_1 no pueden sintetizar ATP. F_1 aislado cataliza la hidrólisis de ATP (reacción inversa a la síntesis), lo cual hizo que inicialmente se le denominara **F_1 ATPasa.** Cuando se añade una preparación de F_1 aislada a tales vesículas, se reasocia con F_o, tapando su poro protónico y restaurando la capacidad de las membranas de acoplar la transferencia electrónica y la síntesis de ATP.

En la superficie de F_1 el ATP está estabilizado en relación al ADP

Los experimentos de intercambio isotópico con F_1 purificado muestran un hecho notable sobre el mecanismo catalítico del enzima: en la superficie del enzima, la reacción ADP + $P_i \rightleftharpoons$ ATP + H_2O es fácilmente reversible: ¡la energía libre de la síntesis de ATP es cercana a cero! Cuando F_1 hidroliza ATP en agua marcada con ^{18}O, el P_i formado contiene un átomo de ^{18}O. La medida cuidadosa del contenido en ^{18}O del P_i formado in vitro por la hidrólisis del ATP catalizada por F_1 muestra que el P_i contiene, no uno, sino tres o cuatro átomos de ^{18}O **(Fig. 19–23)**. Ello indica que el enlace pirofosfato terminal del ATP se rompe y rehace repetidamente antes de que el P_i abandone la superficie del enzima. Con el P_i libre para dar tumbos en su sitio de unión, cada hidrólisis inserta ^{18}O al azar en una de las cuatro posiciones del P_i. Esta reacción de intercambio se da en complejos F_oF_1 sin energía (sin gradiente protónico) y con F_1 aislado; el intercambio no requiere el aporte de energía.

Los estudios cinéticos de las velocidades iniciales de la síntesis e hidrólisis del ATP confirman la conclusión de que la $\Delta G'^{\circ}$ de la síntesis del ATP sobre el enzima es cercana a cero. A partir de las velocidades medidas de hidrólisis ($k_1 = 10\ s^{-1}$) y de síntesis ($k_{-1} = 24\ s^{-1}$), la constante de equilibrio calculada para la reacción

$$\text{Enz-ATP} \rightleftharpoons \text{Enz-(ADP + P}_i\text{)}$$

es

$$K'_{eq} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{24\ s^{-1}}{10\ s^{-1}} = 2{,}4$$

A partir de esta K'_{eq}, la $\Delta G'^{\circ}$ aparente calculada es cercana a cero. Ello contrasta con la K'_{eq} de unos 10^5 ($\Delta G'^{\circ} = -30{,}5$ kJ/mol)

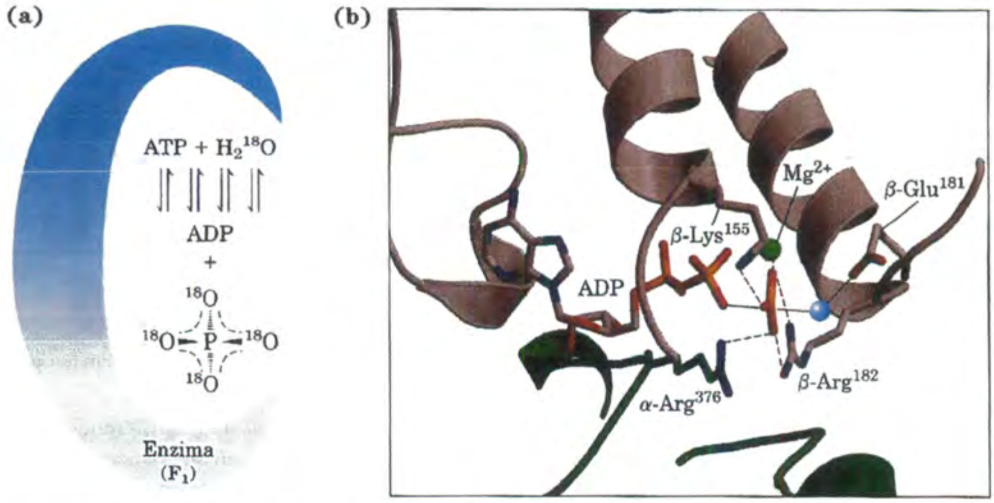


FIGURA 19–23 Mecanismo catalítico de F_1. **(a)** Experimento de intercambio de ^{18}O. F_1 solubilizado a partir de membranas mitocondriales se incuba con ATP en presencia de agua marcada con ^{18}O. A intervalos, se toma una muestra de la solución y se analiza la incorporación de ^{18}O en el P_i producido en la hidrólisis del ATP. En unos minutos, el P_i contiene tres o cuatro átomos de ^{18}O, lo que indica que tanto la hidrólisis como la síntesis de ATP han tenido lugar varias veces durante la incubación. **(b)** Probable complejo del estado de transición para la síntesis e hidrólisis del ATP en la ATP sintasa (de PDB ID 1BMF). La subunidad β se muestra en verde, la β en gris. Los residuos cargados positivamente β-Arg^{182} y α-Arg^{376} coordinan dos oxígenos del intermedio fosfato pentacovalente; β-Lys^{155} interacciona con un tercer oxígeno y el ión Mg^{2+} (esfera verde) estabiliza aún más el intermedio. La esfera azul representa el grupo saliente (H_2O). Estas interacciones tienen como resultado un rápido equilibrio de ATP y ADP + P_i en el sitio activo.

para la hidrólisis del ATP libre en solución (no en la superficie del enzima).

¿A qué se debe esta gran diferencia? La ATP sintasa estabiliza el ATP respecto al ADP y al P_i uniendo el ATP más fuertemente, liberando la energía suficiente para contrarrestar el efecto de hacer ATP. Las medidas cuidadosas de las constantes de unión muestran que F_oF_1 une ATP con una afinidad muy alta ($K_d \leq 10^{-12}$ M) y el ADP con una afinidad mucho menor ($K_d \approx 10^{-5}$ M). Esta diferencia en K_d se corresponde a una diferencia en energía de unión de unos 40 kJ/mol, y esta energía impulsa el equilibrio hacia la formación del producto ATP.

El gradiente de protones impulsa la liberación del ATP de la superficie del enzima

Aunque la ATP sintasa equilibra el ATP con ADP + P_i, el ATP recién sintetizado no abandona la superficie del enzima en ausencia de un gradiente de protones. Es el gradiente protónico el que provoca que el enzima libere el ATP de su superficie. El diagrama de la coordenada de la reacción del proceso **(Fig. 19–24)** muestra la diferencia entre el mecanismo de la ATP sintasa y el de muchos otros enzimas que catalizan reacciones endergónicas.

Para que la síntesis de ATP sea continua, el enzima debe ciclarse entre una forma que une ATP muy fuertemente y una forma que libera el ATP. Los estudios químicos y cristalográficos de la ATP sintasa revelan la base estructural de esta alternancia en la función.

Cada subunidad β de la ATP sintasa puede adoptar tres conformaciones diferentes

La F_1 mitocondrial tiene nueve subunidades de cinco tipos distintos, con la composición $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. Cada una de las tres subunidades β tiene un sitio catalítico para la síntesis de ATP. La determinación cristalográfica de la estructura de la F_1 por John

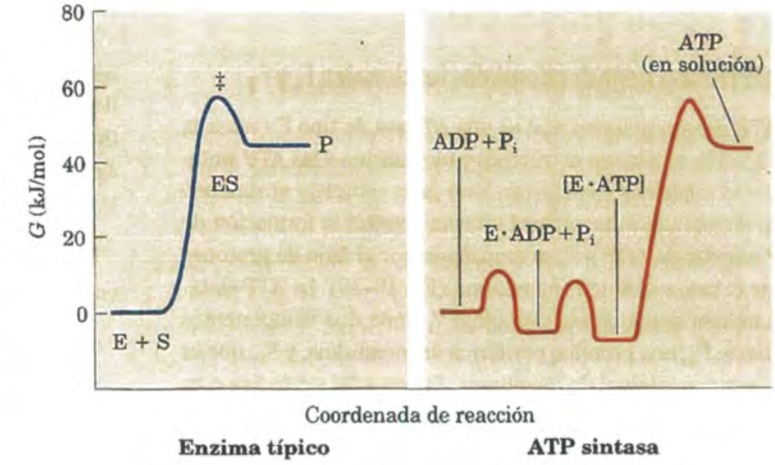
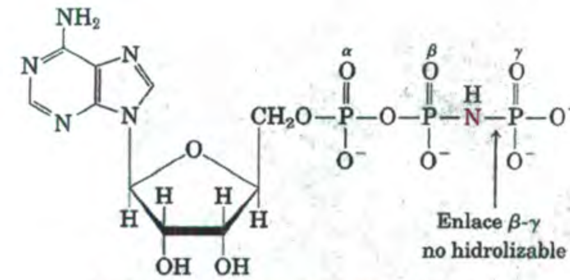


FIGURA 19–24 Diagrama de la coordenada de reacción para la ATP sintasa y para un enzima más típico. En una reacción catalizada por un enzima típico (izquierda), alcanzar el estado de transición (‡) entre sustrato y producto es la principal barrera energética que se ha de superar. En la reacción catalizada por la ATP sintasa (derecha), la principal barrera es la liberación del ATP del enzima, no su formación. La variación de energía libre para la formación de ATP a partir de ADP y P_i en solución acuosa es grande y positiva, pero en la superficie del enzima la muy fuerte unión del ATP proporciona suficiente energía de unión para hacer que la energía libre del ATP ligado al enzima sea próxima a la del ADP + P_i, por lo que la reacción es fácilmente reversible La constante de equilibrio es próxima a 1. La fuerza protón-motriz proporciona la energía libre necesaria para la liberación del ATP.

E. Walker y sus colegas muestra detalles estructurales muy útiles para explicar el mecanismo catalítico del enzima. La porción en forma de pomo que sobresale de F_1 es una esfera aplanada de 8 nm de altura y 10 nm de diámetro formada por subunidades α y β alternadas, con una ordenación a modo de gajos de naranja **(Fig. 19–25a, b, c)**. Los polipéptidos que constituyen el tallo se ordenan de manera asimétrica en la estructura cristalográfica de F_1, con un dominio de la única subunidad γ actuando como un eje central que atraviesa F_1 y otro dominio de γ asociado principalmente con una de las tres subunidades β, la designada β-vacía (19–25c). Aunque las secuencias de aminoácidos de las tres subunidades β son idénticas, *sus conformaciones difieren* en parte por la asociación de la subunidad γ con sólo una de las tres. Las estructuras de la subunidades δ y ε no se revelan en estos estudios cristalográficos.

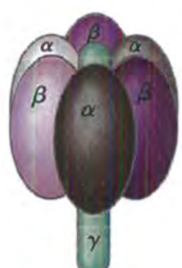
La diferencias en conformación entre las subunidades β se extienden a diferencias en sus sitios de unión de ATP/ADP. Cuando se cristalizó la proteína en presencia de ADP y App(NH)p, un análogo estructural muy parecido al ATP pero que no puede ser hidrolizado por la actividad ATPasa de F_1, se encontró App(NH)p en el sitio de unión de una de las tres subunidades β, ADP en otra, mientras que la tercera se encontraba vacía. Las correspondientes conformaciones de la subunidad β se denominan β-ATP, β-ADP y β-vacía (19–25c). Esta diferencia en la unión de nucleótidos entre las tres subunidades es esencial en el mecanismo del complejo.



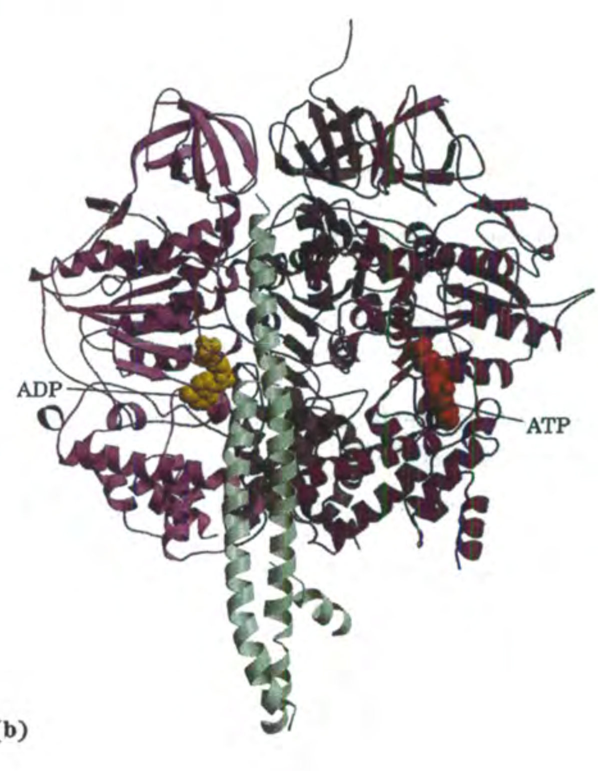
App(NH)p (β,γ-imidoadenosina 5′-trifosfato)

El complejo F_o que forma el poro protónico está compuesto por tres subunidades, a, b, y c, en la proporción ab_2c_{10-12}. La subunidad c es un polipéptido pequeño (M_r 8.000), muy hidrofóbico, que consiste casi exclusivamente en dos hélices trans-

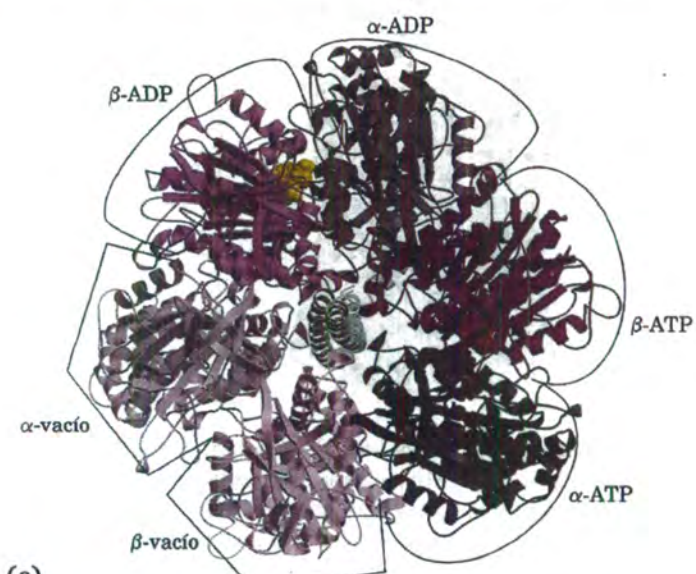
John E. Walker



(a)



(b)



(c)

FIGURA 19–25 Complejo de la ATP sintasa mitocondrial. (a) Estructura del complejo F_1 deducida a partir de estudios cristalográficos y bioquímicos. En F_1, tres subunidades α y tres β se ordenan a modo de gajos de naranja, alternando subunidades α (sombreadas en gris) y β (sombreadas en púrpura) alrededor de un eje central, la subunidad γ (verde). **(b)** Estructura cristalina de F_1 bovina (PDB ID 1BMF) en visión lateral. Se han eliminado dos subunidades α y una β para poder visualizar el eje central (subunidad γ) y los sitios de unión del ATP y ADP en las subunidades β. Las subunidades δ y ε no se muestran aquí. **(c)** F_1 en visión superior (es decir, desde el lado N de la membrana), mostrando las tres subunidades β y las tres subunidades α y el eje central (subunidad γ verde). Cada subunidad β cerca de su interfase con la subunidad α vecina tiene un sitio de unión a nucleótidos esencial en la actividad catalítica. La única subunidad γ se asocia principalmente con uno de los tres pares $\alpha\beta$, provocando que cada una de las tres subunidades β tenga una conformación ligeramente diferente con sitios de unión a nucleótidos diferentes. En el enzima cristalino, una subunidad (β-ADP) contiene ADP (amarillo) en su sitio de unión, la siguiente (β-ATP) contiene ATP (rojo), y la tercera (β-vacía) no contiene nucleótido unido.

(continúa en la página siguiente)

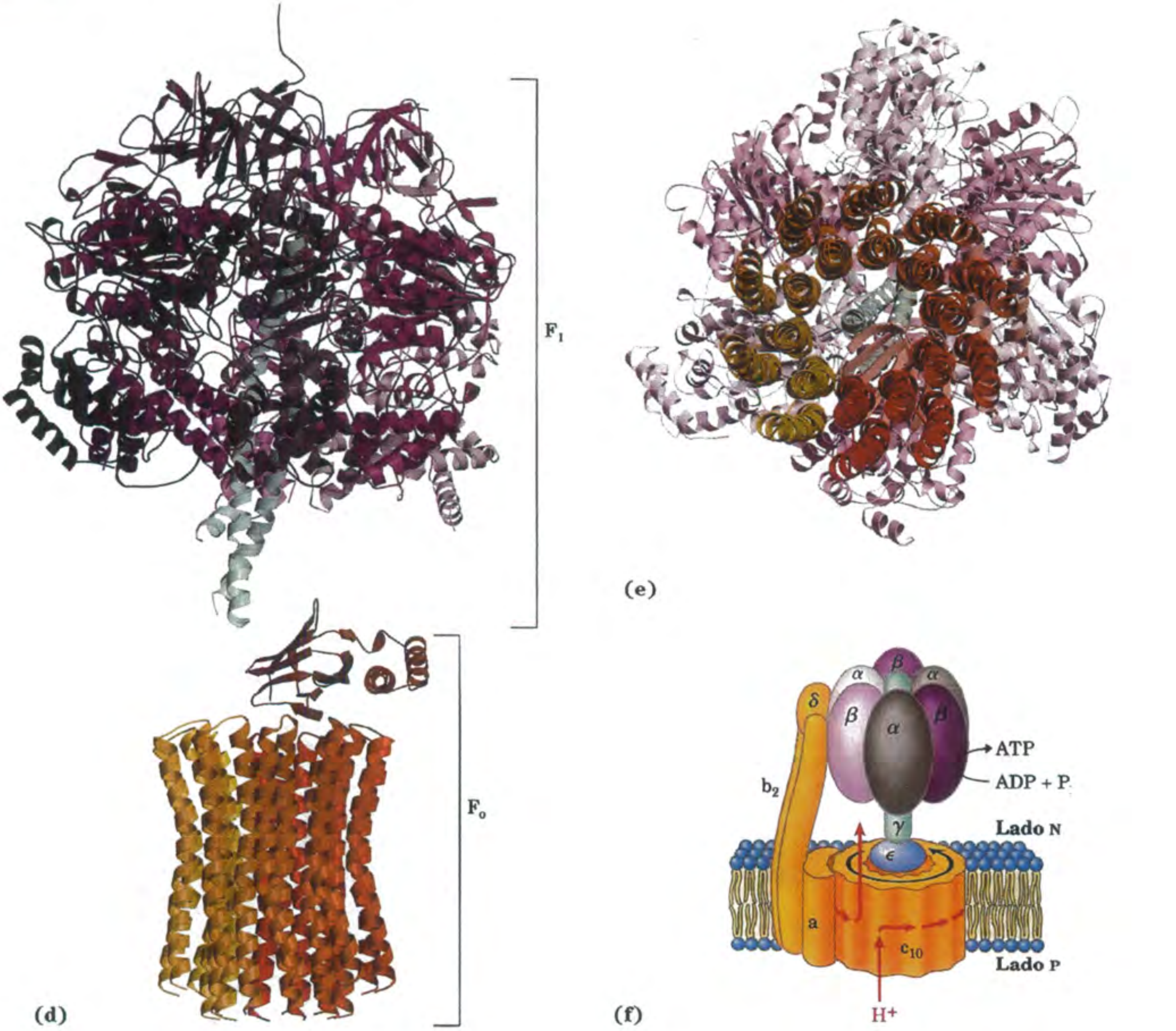


FIGURA 19–25 (continuación) **(d)** Visión lateral de la estructura de F_oF_1. Se muestra una composición, en la que las coordenadas cristalográficas de F_1 de mitocondria bovina (sombreado púrpura y gris) se han combinado con las de la F_o de la mitocondria de levadura (sombreado amarillo y naranja) (PDB ID 1QO1). Las subunidades a, b, δ y ε no formaban parte de la estructura cristalográfica aquí mostrada. **(e)** Estructura F_oF_1, vista de lado en el sentido desde el lado P hacia el lado N. Las estructuras visibles principales en esta sección transversal son las dos hélices transmembrana de cada una de las diez subunidades c ordenadas en círculos concéntricos. **(f)** Diagrama del complejo F_oF_1, deducido a partir de estudios cristalográficos y bioquímicos. Las dos subunidades b (b_2) de F_o se asocian fuertemente con las subunidades α y β de F_1, fijándolas en relación a la membrana. En F_o, el cilindro de subunidades c (c_{10}) incrustado en la membrana está unido al eje formado por las subunidades γ y ε de F_1. Al pasar los protones por la membrana desde el lado P hacia el lado N vía F_o, el cilindro y el eje rotan, y las subunidades β de F_1 cambian de conformación a medida que la subunidad γ se asocia con cada una en su rotación.

membrana, con un pequeño lazo que se extiende desde el lado de la matriz de la membrana. La estructura cristalográfica de la F_oF_1 de levadura, resuelta en 1999, muestra el ordenamiento de las subunidades c. El complejo de levadura tiene 10 subunidades c, cada una de las cuales contiene dos hélices transmembrana aproximadamente perpendiculares al plano de la membrana, que se ordenan en dos círculos concéntricos (Fig. 19–25d, e). Los extremos amino de las hélices de cada subunidad c forman el círculo interno; el círculo externo, de unos 55 Å de diámetro, se forma con las hélices carboxilo terminales. Las subunidades ε y γ de F_1 forman respectivamente una especie de pierna y pie que sobresalen desde el lado de abajo de F_1 (membrana), sujetándose fuertemente en el anillo que forman las subunidades c. Se puede combinar la información estructural obtenida en los estudios de F_1 bovina y de F_oF_1 de levadura para obtener el dibujo esquemático de la Figura 19–25f.

La catálisis rotacional es la clave en el mecanismo de unión y cambio de la síntesis de ATP

Sobre la base de detallados estudios cinéticos y de unión de las reacciones catalizadas por F_oF_1, Paul Boyer propuso un mecanismo de **catálisis rotacional** en el que los tres sitios activos situados sobre F_1 alternan en la catálisis de la síntesis de ATP **(Fig. 19–26)**. Una subunidad β determinada empieza en conformación β-ADP, que une ADP y P_i del medio. A continuación la subunidad cambia de conformación, adoptando la forma β-ATP, que une y estabiliza fuertemente el ATP, hecho que

Paul Boyer

comporta el rápido equilibrio del ADP + P_i con el ATP en la superficie del enzima. Finalmente, la subunidad cambia hacia la conformación β-vacía, que tiene una afinidad muy baja por el ATP, por lo que el ATP recién sintetizado se libera de la superficie del enzima. Cuando esta subunidad vuelve a adoptar la conformación β-ADP, se une ADP + P_i, con lo que se inicia otra ronda de catálisis.

Los cambios de conformación, esenciales en este mecanismo, están impulsados por el paso de protones a través de la porción F_o de la ATP sintasa. La corriente de protones a través del "poro" F_o hace que el cilindro formado por las subunidades c y la subunidad γ anclada roten alrededor del eje mayor de γ, que es perpendicular al plano de la membrana. La subunidad γ pasa a través del centro del esferoide $\alpha_3\beta_3$, que se mantiene quieto respecto a la superficie de la membrana gracias a las subunidades b_2 y δ (Fig. 19–25f). Con cada rotación de 120°, γ se pone en contacto con una subunidad β diferente, y el contacto provoca el cambio de la subunidad β a la conformación β-vacía.

Las tres subunidades β interaccionan de tal modo que cuando una adopta la conformación β-vacía, la vecina de un lado *ha de* adoptar la conformación β-ADP y la del otro la β-ATP. Por lo tanto, una rotación completa de la subunidad γ provoca que cada subunidad β se cicle a través de sus tres conformaciones posibles, y en cada rotación se sintetizan y se liberan de la superficie del enzima tres moléculas de ATP.

Una predicción inmediata de este modelo de unión y cambio es que la subunidad γ debería rotar en un sentido cuando F_oF_1 sintetiza ATP, y en el sentido opuesto cuando lo hidroliza. Está predicción se demostró con los elegantes experimentos llevados a cabo en los laboratorios de Masasuke Yoshida y Kazuhiko Kinosita, Jr. La rotación de γ en una única molécula de F_1 se visualizó en un microscopio gracias a la unión de un polímero de actina fluorescente, molécula larga y delgada, a γ y observando como al hidrolizarse ATP se mueve en relación a $\alpha_3\beta_3$, que había sido inmovilizada previamente en un portaobjetos del microscopio. Cuando se realizó el mismo experimento con el complejo F_oF_1 completo (no únicamente F_1), la totalidad del anillo formado por subunidades c rotó con γ **(Fig. 19–27)**. La "varilla" rotó en la dirección predicha los 360°. La rotación no fue suave, sino que se dio en tres pasos discretos de 120°. La eficiencia de este mecanismo al convertir energía química en movimiento es cercana al 100%, como se puede calcular a partir de la velocidad de hidrólisis conocida de ATP por una molécula de F_1 y la fuerza de fricción sobre el largo polímero de actina. En palabras de Boyer, "¡una máquina molecular espléndida!".

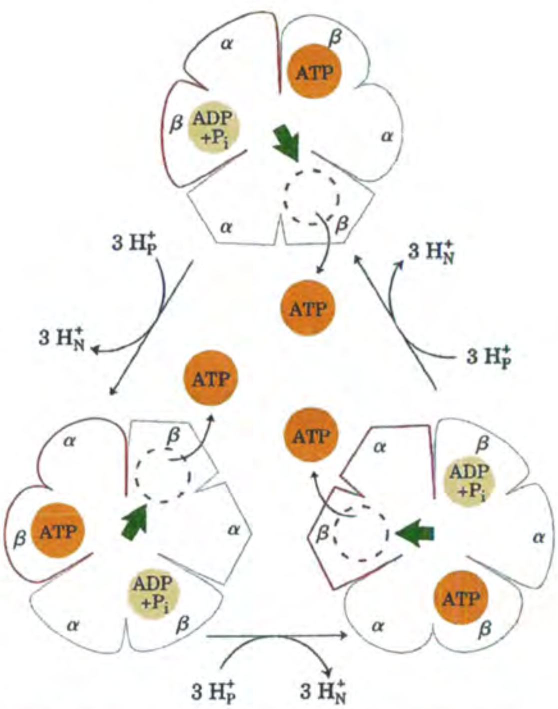


FIGURA 19–26 Modelo de cambio de unión para la ATP sintasa. El complejo F_1 tiene tres sitios de unión de nucleótidos de adenina no equivalentes, uno por cada par de subunidades α y β. En un momento determinado, uno de estos sitios está en la conformación β-ATP (que une ATP fuertemente), un segundo está en la conformación β-ADP (unión débil) y un tercero está en la conformación β-vacía (unión muy débil). La fuerza protón-motriz hace que el eje central subunidad γ, mostrada como una flecha verde, rote y que se ponga en contacto con cada par de subunidades $\alpha\beta$ de forma sucesiva. Ello produce un cambio de conformación cooperativo en el que el sitio β-ATP se convierte en la conformación β-vacía y el ATP se disocia; el sitio β-ADP se convierte en la conformación β-ATP, que promueve la condensación del ADP y P_i unidos para formar ATP; y el sitio β-vacío se convierte en un sitio β-ADP, que une débilmente ADP y P_i que difunden desde el disolvente. Este modelo, basado en observaciones experimentales, requiere que al menos dos de los tres sitios catalíticos alternen en actividad; el ATP no se puede liberar de uno de los sitios hasta que se fijen ADP y P_i al otro.

El acoplamiento quimiosmótico permite que las estequiometrías del consumo de O_2 y de la síntesis de ATP no se correspondan con números enteros

Antes de la aceptación general del modelo quimiosmótico para la fosforilación oxidativa se pensaba que la ecuación para la reacción global tendría la siguiente forma:

$$x\text{ADP} + x\text{P}_i + \tfrac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADH} \longrightarrow x\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ \quad (19\text{–}11)$$

siendo el valor de x, algunas veces llamado la **razón P/O** o **razón P/2e⁻**, un número entero. Tanto la síntesis de ATP como el consumo de O_2 se pueden medir si se suspenden mitocondrias intactas en una solución con un sustrato oxidable, tal como el succinato o el NADH, y se aporta O_2. Sin embargo, la medida de P/O se complica por el hecho de que las mitocondria intactas consumen ATP en muchas reacciones que se dan en la matriz, junto al consumo de O_2 con otros fines diferentes a la fosforilación oxidativa. La mayor parte de los experimentos daban una razón P/O (ATP a $\frac{1}{2}O_2$) de entre 2 y 3 cuando se utilizaba NADH como dador de electrones, y entre 1 y 2 cuando se utilizaba succinato. Dando por sentado que P/O había de dar un número entero, la mayor parte de los científicos creyeron que la razón P/O debía ser de 3 para el NADH y 2 para

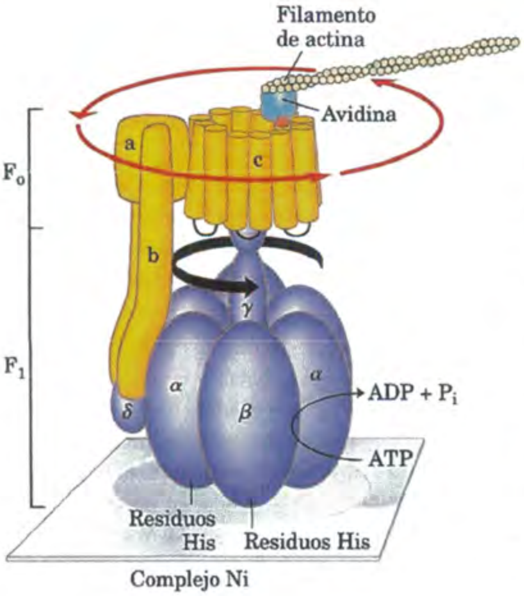
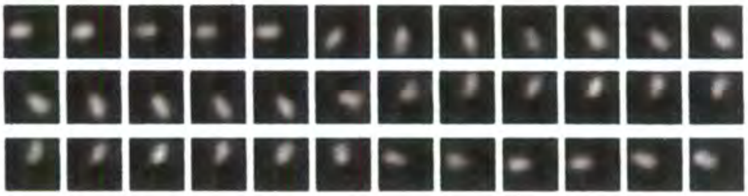


FIGURA 19–27 Rotación de F_o y γ demostrada experimentalmente. F_1 rediseñado por técnicas de ingeniería genética para contener una serie de residuos His se une fuertemente a un portaobjetos de microscopio recubierto con un complejo de Ni; se une biotina covalentemente a una subunidad c de F_o. La proteína avidina, que se une muy fuertemente a la biotina, está unida covalentemente a largos filamentos de actina marcados con una sonda fluorescente. La unión de biotina-avidina une ahora los filamentos de actina a la subunidad c. Cuando se aporta ATP como sustrato de la actividad ATPasa de F_1, se observa como el filamento marcado gira continuamente en una dirección, demostrando que el cilindro F_o de subunidades c rota. En otro experimento, el filamento de actina se unió directamente sobre la subunidad γ. La serie de micrografías de fluorescencia (leídas de izquierda a derecha) muestra la posición del filamento de actina a intervalos de 133 ms. Observe que a medida que gira el filamento, se produce un salto discreto cada once marcos. Probablemente el cilindro y el eje se mueven como una unidad.



el succinato, y durante muchos años estos valores se han encontrado en artículos de investigación y en libros de texto.

Con la introducción del paradigma quimiosmótico del acoplamiento de la síntesis de ATP con la transferencia electrónica, no había ninguna necesidad teórica de que la razón P/O fuera un número entero. Las preguntas pertinentes sobre la estequiometría se transformaron en: ¿cuántos protones se bombean hacia afuera por la transferencia electrónica desde un NADH al O_2? ¿Y cuántos protones han de entrar a través de complejo F_oF_1 para impulsar la síntesis de un ATP? La medida del flujo de protones es técnicamente complicada; se han de tener en cuenta la capacidad amortiguadora de las mitocondrias, las pérdidas no productivas de protones a través de la membrana interna y el uso de gradientes de protones en funciones diferentes de la síntesis de ATP, tales como el transporte de sustratos a través de la membrana mitocondrial interna (descrito más adelante). El valor consenso de los protones que se bombean hacia afuera por par de electrones es de 10 para el NADH y de 6 para el succinato. El valor experimental más aceptado para el número de protones necesarios para impulsar la síntesis de una molécula de ATP es de 4, de los cuales uno se utiliza en el transporte de P_i, ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial (véase más adelante). Si por cada NADH se bombean hacia afuera 10 protones y para producir un ATP entran 4, la razón P/O basada en los protones es de 2,5 cuando el NADH es el dador y 1,5 (6/4) cuando lo es el succinato. Utilizaremos los valores 2,5 y 1,5 para la razón P/O en todo este libro, aunque los valores de 3 y 2 todavía se suelan encontrar en la literatura bioquímica. Hasta que no se conozcan los detalles completos del mecanismo de reacción de F_oF_1, no se podrá decir la última palabra sobre la estequiometría de protones.

La fuerza protón-motriz suministra energía para el transporte activo

Aunque el papel principal del gradiente de protones en la mitocondria es suministrar energía para la síntesis de ATP, la fuerza protón-motriz también sirve para impulsar varios procesos de transporte esenciales para la fosforilación oxidativa. La membrana mitocondrial interna es por lo general impermeable a las especies cargadas, pero hay dos sistemas específicos que transportan ADP y P_i a la matriz y ATP hacia el citosol **(Fig. 19–28)**.

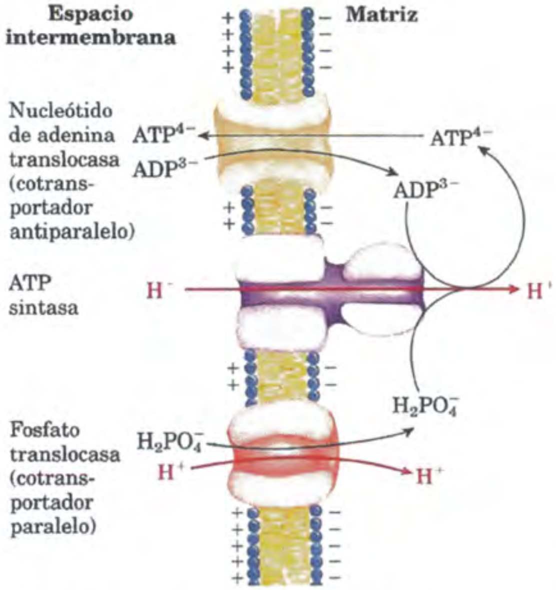


FIGURA 19–28 Nucleótido de adenina y fosfato translocasas. Sistemas de transporte de la membrana mitocondrial interna transportan ADP y P_i al interior de la matriz permitiendo que salga el ATP *recién sintetizado al citosol. La nu*cleótido de adenina translocasa es un sistema de cotransporte antiparalelo; la misma proteína lleva ADP a la matriz y ATP al exterior. El efecto de reemplazar ATP^{4-} por ADP^{3-} en la matriz es la salida neta de una carga negativa, lo que está favorecido por la diferencia de carga a través de la membrana interna (exterior positivo). A pH 7, el P_i se halla presente tanto en forma de HPO_4^{2-} como de $H_2PO_4^-$, mientras que la fosfato translocasa es específica para $H_2PO_4^-$. No hay flujo neto de carga durante el cotransporte paralelo de $H_2PO_4^-$ y H^+ pero la concentración de protones relativamente baja en la matriz favorece el movimiento de H^+ hacia el interior. De este modo la fuerza protón-motriz es responsable tanto de proporcionar la energía para la síntesis de ATP como del transporte de sustratos (ADP y P_i) al interior y del producto (ATP) fuera de la matriz mitocondrial. Estos tres sistemas de transporte se pueden aislar como un único complejo ligado a la membrana (ATP sintasoma).

La **nucleótido de adenina translocasa,** integral de la membrana interna, une ADP^{3-} en el espacio intermembrana y lo transporta a la matriz en intercambio con una molécula de ATP^{4-} transportada simultáneamente hacia el exterior (véase la Fig. 13–11 para las formas iónicas del ATP y ADP). Debido a que este cotransportador antiparalelo transporta cuatro cargas negativas hacia fuera a cambio de tres que entran, su actividad viene favorecida por el gradiente electroquímico transmembrana que le proporciona a la matriz una carga neta negativa; la fuerza protón-motriz impulsa el intercambio ATP-ADP. La nucleótido de adenina translocasa es inhibida específicamente por el atractilósido, un glucósido tóxico producido por una especie de cardo. Si se inhibe el transporte de ADP al interior y de ATP al exterior de la mitocondria, no se puede regenerar el ATP citosólico a partir del ADP, lo que explica la toxicidad del atractilósido.

Un segundo sistema de transporte de la membrana esencial para la fosforilación oxidativa es la **fosfato translocasa,** que promueve el cotransporte paralelo de un $H_2PO_4^-$ y un H^+ al interior de la matriz. Este proceso de transporte también está favorecido por el gradiente de protones transmembrana (Fig. 19–28). Observe que el proceso requiere que un protón pase del lado P al lado N de la membrana interna, consumiendo parte de la energía de la transferencia electrónica. Mediante disección suave de la mitocondria con detergentes puede aislarse un complejo de la ATP sintasa y las dos translocasas, el **ATP sintasoma,** lo que sugiere que las funciones de estas tres proteínas están fuertemente integradas.

Sistemas de lanzadera envían indirectamente NADH citosólico a la mitocondria para su oxidación

La NADH deshidrogenasa de la membrana mitocondrial interna de células animales sólo puede aceptar electrones del NADH de la matriz. Dado que la membrana interna no es permeable al NADH, ¿cómo puede reoxidarse el NADH generado por la glucólisis en el citosol a NAD^+ por el O_2 vía la cadena respiratoria? Sistemas especiales de lanzadera transportan equivalentes de reducción desde el NADH citosólico a las mitocondrias mediante una ruta indirecta. La lanzadera de NADH más activa, que funciona en las mitocondrias de hígado, riñón y corazón, es la **lanzadera del malato-aspartato (Fig. 19–29).** Los equivalentes de reducción del NADH citosólico se transfieren en primer lugar al oxalacetato citosólico, obteniéndose malato por acción de la malato deshidrogenasa citosólica. El malato así for-

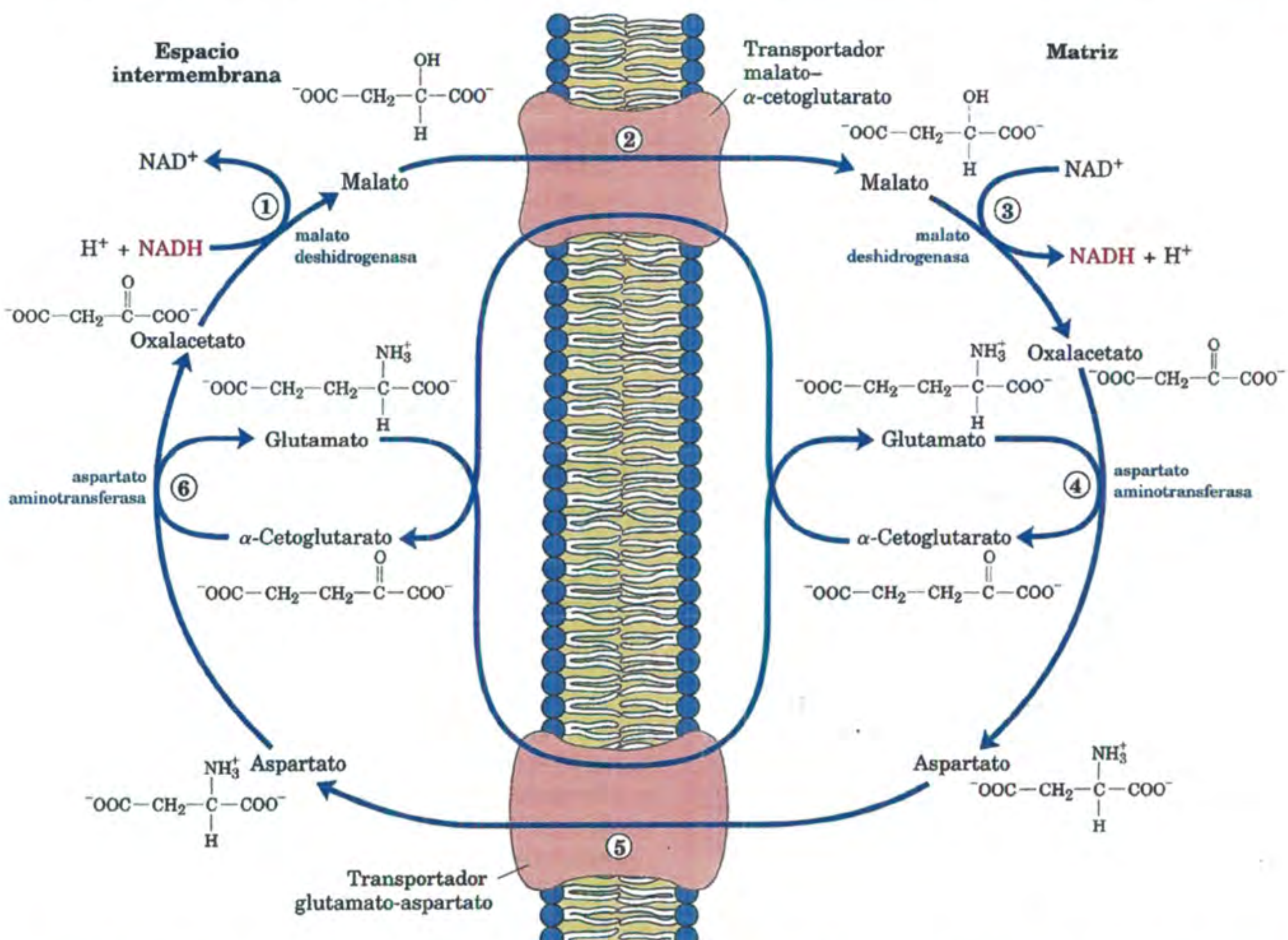


FIGURA 19–29 Lanzadera del malato-aspartato. Esta lanzadera para transportar equivalentes de reducción desde el NADH citosólico a la matriz mitocondrial se utiliza en hígado, riñón y corazón. ① El NADH del citosol (espacio intermembrana) pasa dos equivalentes de reducción al oxalacetato, produciendo malato. ② El malato atraviesa la membrana interna por el transportador de malato-α-cetoglutarato. ③ En la matriz el malato pasa dos equivalentes de reducción al NAD^+; el NADH resultante es oxidado por la cadena respiratoria; el oxalacetato formado a partir del malato no puede pasar directamente al citosol. ④ Se transamina primero a aspartato que ⑤ puede salir vía el transportador de glutamato-aspartato. ⑥ En el citosol se regenera el oxalacetato, con lo que completa el ciclo.

mado pasa a través de la membrana interna mediante el sistema de transporte del malato–α-cetoglutarato. Dentro de la matriz los equivalentes de reducción pasan por acción de la malato deshidrogenasa mitocondrial al NAD^+, formando NADH; este NADH puede pasar electrones de forma directa a la cadena respiratoria. En el paso de este par de electrones al O_2 se generan unas 2,5 moléculas de ATP. El oxalacetato citosólico debe regenerarse mediante reacciones de transaminación así como mediante la actividad de los transportadores de membrana para empezar otro ciclo de la lanzadera.

El músculo esquelético y el cerebro utilizan una lanzadera diferente del NADH, la **lanzadera del glicerol 3-fosfato (Fig. 19–30)**. Difiere de la lanzadera del malato-aspartato en que cede los equivalentes de reducción desde el NADH a la ubiquinona y de ella al Complejo III, no al Complejo I (Fig. 19–8), con lo que sólo proporciona energía para la síntesis de 1,5 moléculas de ATP por par de electrones.

Las mitocondrias de las plantas tienen una NADH deshidrogenasa orientada hacia el *exterior* que puede transferir electrones directamente desde el NADH citosólico a la cadena respiratoria al nivel de la ubiquinona. Debido a que esta vía no utiliza el paso por la NADH deshidrogenasa del Complejo I y el movimiento de protones asociado, la cantidad de ATP producida a partir del NADH citosólico es menor que la producida a partir del NADH generado en la matriz (Recuadro 19–1).

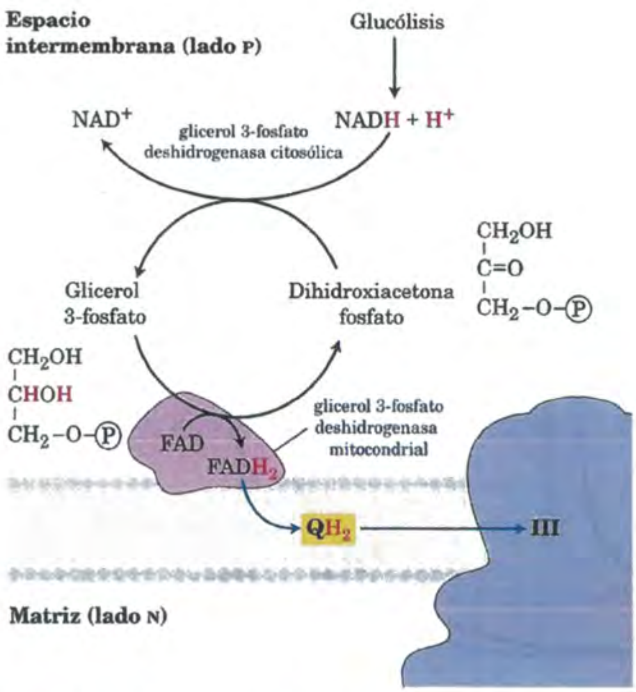


FIGURA 19–30 Lanzadera del glicerol 3-fosfato. Este medio alternativo para transportar equivalentes de reducción desde el citosol a la matriz mitocondrial actúa en el músculo esquelético y en el cerebro. En el citosol, la dihidroxiacetona fosfato acepta dos equivalentes de reducción del NADH en una reacción catalizada por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica. Un isozima de ésta unido a la cara exterior de la membrana interna transfiere dos equivalentes de reducción desde el glicerol 3-fosfato del espacio intermembrana a la ubiquinona. Observe que esta lanzadera no necesita sistemas de transporte de membranas.

RESUMEN 19.2 Síntesis de ATP

- El flujo de electrones a través de los Complejos I, III y IV da lugar al bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna haciendo que la matriz sea alcalina con respecto al espacio intermembrana. Este gradiente de protones suministra la energía (en la forma de fuerza protón-motriz) para la síntesis del ATP a partir del ADP y P_i por la ATP sintasa (complejo F_oF_1) de la membrana interna.
- La ATP sintasa lleva a cabo "catálisis rotacional" en la que el flujo de protones a través de F_o hace que cada uno de los tres sitios de unión de nucleótidos de F_1 cicle desde la conformación que une (ADP + P_i) a la que une ATP y finalmente a la vacía.
- La formación del ATP por el enzima requiere poca energía; el papel de la fuerza protón-motriz es empujar el ATP fuera de su sitio de unión en la sintasa.
- La proporción de ATP sintetizado por $\frac{1}{2}O_2$ reducido a H_2O (la razón P/O) es de unos 2,5 cuando los electrones entran en la cadena respiratoria en el Complejo I y de 1,5 cuando los electrones entran en la ubiquinona.
- La energía conservada en un gradiente de protones puede impulsar el transporte de solutos contra gradiente a través de una membrana.
- La membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH y al NAD^+, pero se transportan equivalentes de NADH desde el citosol a la matriz por una de dos lanzaderas. Los equivalentes de NADH que se transportan mediante la lanzadera del malato-aspartato entran en la cadena respiratoria por el Complejo I, dando una razón P/O de 2,5; los que se transportan por la lanzadera del glicerol 3-fosfato entran por la ubiquinona y dan una razón P/O de 1,5.

19.3 Regulación de la fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa sintetiza la mayor parte del ATP que se produce en las células aeróbicas. La oxidación completa de una molécula de glucosa a CO_2 da lugar a la formación de 30 o 32 ATP (Tabla 19–5). En comparación, la glucólisis en condiciones anaeróbicas (fermentación láctica) genera sólo dos ATP por glucosa. Resulta evidente que la evolución de la *fosforilación oxidativa* originó un enorme incremento en la eficiencia energética del catabolismo. La oxidación completa a CO_2 del derivado del coenzima A y del palmitato (16:0), que también se da en la matriz mitocondrial, da un rendimiento de 108 ATP por palmitil-CoA (véase la Tabla 17–1). Se puede realizar un cálculo similar del rendimiento en ATP para la oxidación de cada uno de los aminoácidos (Capítulo 18). Las vías oxidativas aeróbicas que acaban en la transferencia de electrones al O_2 junto a la fosforilación oxidativa son las responsables de la mayor parte del ATP que se produce en el catabolismo. Por lo tanto, es absolutamente esencial que se regule la producción de ATP en la fosforilación oxidativa para adaptarse a las necesidades fluctuantes de ATP de la célula.

TABLA 19–5 Rendimiento de ATP en la oxidación completa de la glucosa

Proceso	Producto directo	ATP finales
Glucólisis	2 NADH (citosólico)	3 o 5*
	2 ATP	2
Oxidación del piruvato (dos por glucosa)	2 NADH (matriz mitocondrial)	5
Oxidación del acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico (dos por glucosa)	6 NADH (matriz mitocondrial)	15
	2 $FADH_2$	3
	2 ATP o 2 GTP	2
Rendimiento total por glucosa		30 o 32

*El número depende del sistema de lanzadera utilizado para transferir los equivalentes de reducción a la matriz mitocondrial.

La fosforilación oxidativa está regulada por las necesidades celulares de energía

La tasa respiratoria (consumo de O_2) en la mitocondria está bajo una regulación precisa; está limitada generalmente por la disponibilidad de ADP como sustrato de la fosforilación. La dependencia de la velocidad de consumo de O_2 de la concentración de ADP, el aceptor del P_i (Fig. 19–20b), el **control por aceptor** de la respiración, puede llegar a ser espectacular. En algunos tejidos animales la **razón del control por aceptor,** la proporción de la velocidad máxima de consumo de O_2 inducida por el ADP a la velocidad basal en ausencia de ADP, es al menos de 10.

La concentración intracelular de ADP es una medida del estatus energético de la célula. Otra medida relacionada con ella es el **cociente de acción de masas** del sistema ATP-ADP: [ATP]/([ADP][P_i]). Normalmente este cociente es muy elevado, de modo que el sistema ATP-ADP está casi completamente fosforilado. Cuando aumenta la velocidad de algunos procesos que requieren energía (síntesis de proteínas, por ejemplo), se produce un aumento en la velocidad de degradación del ATP a ADP y P_i, disminuyendo el cociente de la acción de masas. Con más ADP disponible para la fosforilación oxidativa aumenta la velocidad de la respiración, lo que da lugar a la regeneración de ATP. Ésta continúa hasta que el cociente de acción de masas vuelve a su valor elevado normal, punto en el que la respiración se enlentece de nuevo. La velocidad de oxidación de los combustibles celulares está regulada con tal sensibilidad y precisión que la razón [ATP]/([ADP][P_i]) fluctúa sólo ligeramente en la mayoría de tejidos, incluso durante variaciones extremas en la demanda de energía. En pocas palabras, el ATP se forma a la misma velocidad en que es requerido por las actividades celulares.

Una proteína inhibidora impide la hidrólisis de ATP durante la hipoxia

Ya hemos encontrado la ATP sintasa como una bomba de protones impulsada por ATP (véase la Fig. 11–39) catalizando el inverso de la síntesis de ATP. Cuando una célula está hipóxica (privada de oxígeno), tal como sucede en un infarto de miocardio o una embolia, cesa la transferencia de electrones al oxígeno y cesa también el bombeo de protones. La fuerza protón-motriz desaparece al poco rato. En estas condiciones la ATP sintasa podría operar en sentido inverso, hidrolizando ATP para bombear protones hacia el exterior y causando una disminución desastrosa en los niveles de ATP. Esto no se produce gracias a un inhibidor proteico pequeño (84 aminoácidos), IF_1, que se une simultáneamente a dos moléculas de ATP sintasa inhibiendo su actividad ATPasa **(Fig. 19–31)**. IF_1 sólo es inhibidora en su forma dimérica, que está favorecida a un pH inferior a 6,5. En una célula sin oxígeno, la principal fuente de ATP es la glucólisis con lo que los ácidos pirúvico o láctico así formados disminuyen el pH en el citosol y la matriz mitocondrial. Esto favorece la dimerización de IF_1, que lleva a la inhibición de la actividad ATPasa de la ATP sintasa, impidiendo de este modo la hidrólisis despilfarradora de ATP. Cuando se reanuda el metabolismo aeróbico, se enlentece la formación de pirúvico, el pH del citosol aumenta, se desestabiliza el dímero de IF_1 y desaparece la inhibición de la ATP sintasa.

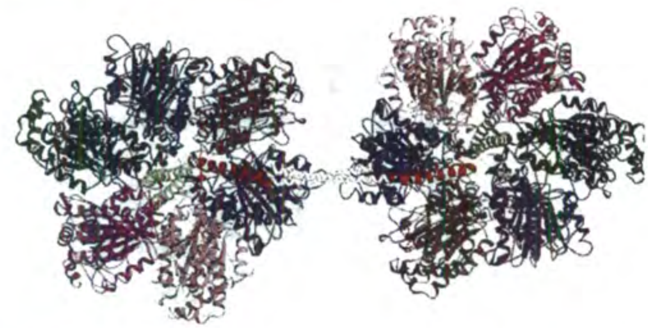


FIGURA 19–31 Estructura de la F_1-ATPasa bovina en un complejo con su proteína reguladora IF_1. (De PDB ID 1OHH) Se ven aquí dos moléculas de F_1 en la misma orientación que en la Figura 19–25c. El inhibidor IF_1 (rojo) se une a la interfase $\alpha\beta$ de las subunidades en la conformación difosfato (ADP) (α-ADP y β-ADP), congelando los dos complejos F_1 y, por tanto, bloqueando la hidrólisis del ATP (y la síntesis). (Partes de IF_1 que no se pudieron resolver en los cristales de F_1 se muestran en perfil blanco tal como aparecen en cristales de IF_1 aislados.) Este complejo sólo es estable al bajo pH citosólico característico de las células que están produciendo ATP por glucólisis; cuando se reanuda el metabolismo aeróbico, el pH citosólico aumenta, se desestabiliza el inhibidor y la ATP sintasa se activa.

La hipoxia conduce a la producción de ROS y a varias respuestas de adaptación

En las células hipóxicas se produce un desequilibrio entre la entrada de electrones procedentes de la oxidación de combustibles en la matriz mitocondrial y la transferencia de electrones al oxígeno molecular, lo que da lugar a un incremento en la forma-

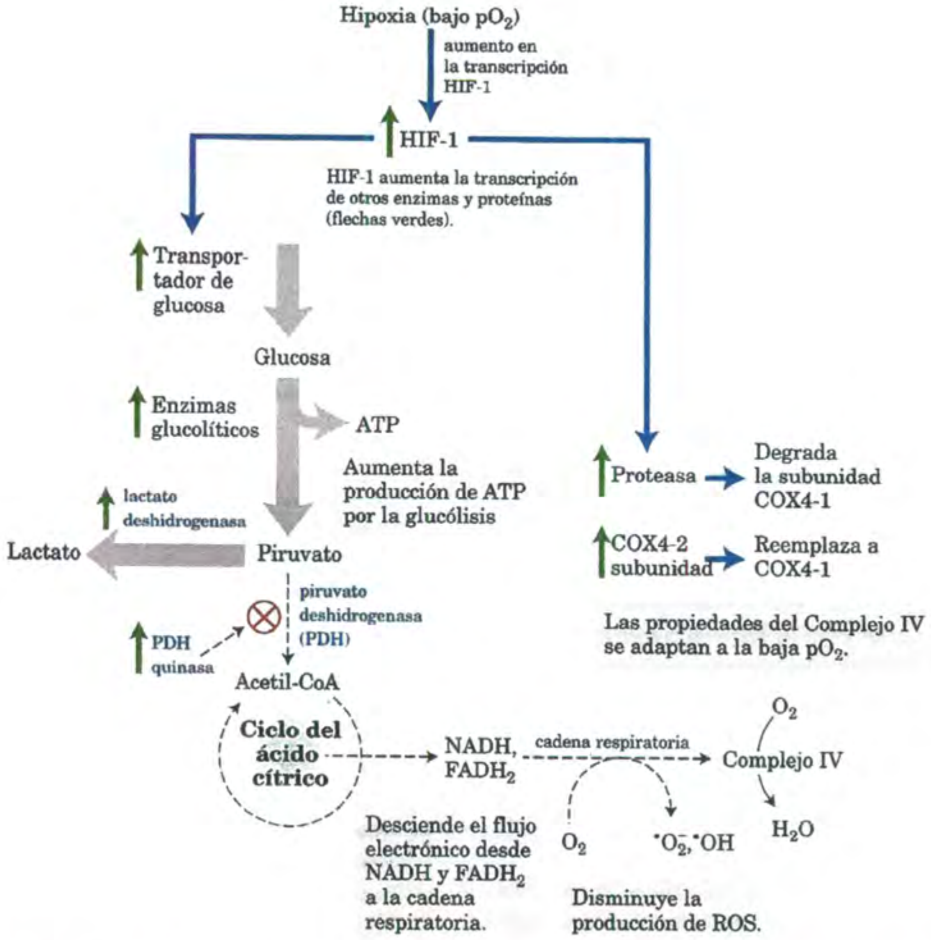


FIGURA 19–32 El factor inducible por la hipoxia (HIF-1) regula la expresión génica para reducir la formación de ROS. En condiciones de baja concentración de oxígeno (hipoxia), se sintetiza HIF-1 en mayor cantidad, que actúa como factor de transcripción que incrementa la síntesis del transportador de glucosa, enzimas glucolíticos, piruvato deshidrogenasa quinasa (PDH quinasa), lactato deshidrogenasa, una proteasa que degrada la subunidad COX4-1 de la citocromo oxidasa y la subunidad COX4-2 de la citocromo oxidasa. Estos cambios contrarrestan la formación de ROS al disminuir el suministro de NADH y $FADH_2$ y hacer que la citocromo oxidasa del Complejo IV sea más efectiva. Las flechas grises gruesas indican reacciones estimuladas por HIF-1; las flechas finas a trazos muestran las reacciones enlentecidas por HIF-1.

ción de especies de oxígeno reactivas. Además del sistema de la glutatión peroxidasa (Fig. 19–18), las células tienen otras dos líneas de defensa contra las ROS **(Fig. 19–32)**. Una es la regulación de la piruvato deshidrogenasa (PDH), enzima que aporta acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16). En condiciones hipóxicas, la PDH quinasa fosforila la PDH mitocondrial, inactivándola y enlenteciendo el suministro de $FADH_2$ y NADH del ciclo del ácido cítrico a la cadena respiratoria. Una segunda forma de impedir la formación de ROS es el reemplazo de una subunidad del Complejo IV, conocida como COX4-1, por otra subunidad, COX4-2, que está mejor adaptada a las condiciones hipóxicas. Con COX4-1, las propiedades catalíticas del Complejo IV son óptimas para la respiración con concentraciones normales de oxígeno; con COX4-2, se optimiza el Complejo IV para operar en condiciones hipóxicas.

Los cambios en la actividad PDH y en el contenido de COX4-2 del Complejo IV están promovidos por HIF-1, el factor inducible por la hipoxia. HIF-1 se acumula en las células hipóxicas y, actuando como factor de transcripción, desencadena un aumento en la síntesis de PDH quinasa, COX4-2 y una proteasa que degrada COX4-1. Recuerde que HIF-1 también interviene en los cambios en el transporte de glucosa y en los enzimas glucolíticos que produce el efecto Pasteur (véase el Recuadro 14–1).

Cuando estos mecanismos para contrarrestar las ROS son insuficientes, debido a mutación genética que afecta una de las proteínas protectoras o en condiciones de muy elevada producción de ROS, la función mitocondrial está en peligro. Se cree que las lesiones mitocondriales intervienen en el envejecimiento, el fallo cardíaco, ciertos casos raros de diabetes (descritos más adelante) y varias enfermedades genéticas heredadas por vía materna que afectan al sistema nervioso. ■

Las rutas de formación de ATP están reguladas de forma coordinada

Las principales rutas catabólicas tienen mecanismos reguladores engranados y concertados que les permiten funcionar conjuntamente en una forma económica y autorreguladora para la producción de ATP y precursores biosintéticos. Las concentraciones relativas de ATP y ADP controlan no sólo las velocidades de transferencia electrónica y fosforilación oxidativa, sino también las velocidades del ciclo del ácido cítrico, oxidación del piruvato y glucólisis **(Fig. 19–33)**. Donde quiera que haya un

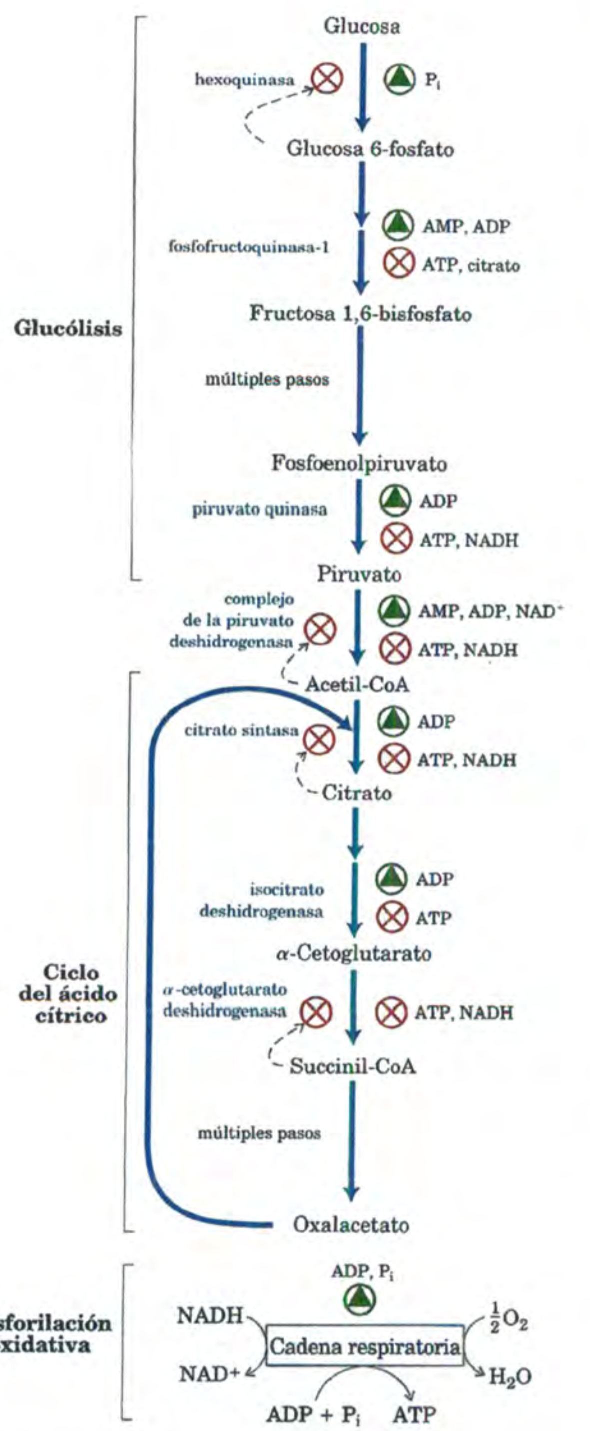


FIGURA 19–33 Regulación de las vías productoras de ATP. Este diagrama muestra la regulación conjunta de la glucólisis, oxidación del piruvato, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa por las concentraciones relativas de ATP, ADP y AMP y por NADH. Alta [ATP] (o baja [ADP] y [AMP]) producen velocidades bajas de glucólisis, oxidación del piruvato, oxidación del acetato vía ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa. Las cuatro rutas están aceleradas cuando hay un aumento en la velocidad de utilización del ATP con un incremento en la formación de ADP, AMP y P_i. El engranaje de la glucólisis con el ciclo del ácido cítrico por el citrato, que inhibe la glucólisis, suplementa la acción del sistema de los nucleótidos de adenina. Además, el aumento en los niveles de NADH y acetil-CoA también inhiben la oxidación del piruvato a acetil-CoA mientras que razones [NADH]/[NAD^+] elevadas inhiben las reacciones de las deshidrogenasas del ciclo del ácido cítrico (véase la Fig. 16–18).

incremento en el consumo de ATP, aumenta la velocidad de transferencia electrónica y de fosforilación oxidativa. Simultáneamente aumenta la velocidad de oxidación del piruvato vía ciclo del ácido cítrico, aumentando el flujo de electrones hacia la cadena respiratoria.

Estos procesos pueden, a su vez, provocar un aumento en la velocidad de glucólisis, aumentando la velocidad de formación del piruvato. Cuando la conversión del ADP a ATP disminuye la concentración de ADP, el control por aceptor hace más lenta la transferencia de electrones y con ello la fosforilación oxidativa. La glucólisis y el ciclo del ácido cítrico también disminuyen su velocidad porque el ATP es un inhibidor alostérico de la fosfofructoquinasa-1 (véase la Fig. 15–14) y de la piruvato deshidrogenasa (véase la Fig. 16–18).

La fosfofructoquinasa-1 es también inhibida por el citrato, el primer intermediario del ciclo del ácido cítrico. Cuando el ciclo está "en reposo" el citrato se acumula en la mitocondria y a continuación se transporta al citosol. Cuando aumentan las concentraciones de ATP y citrato, se produce una inhibición alostérica concertada de la fosfofructoquinasa-1 que es mayor que la suma de sus efectos individuales, disminuyendo la velocidad de la glucólisis.

RESUMEN 19.3 Regulación de la fosforilación oxidativa

- La fosforilación oxidativa está regulada por las necesidades energéticas celulares. La [ADP] intracelular y el cociente de acción de masas [ATP]/([ADP][P_i]) son medidas del estatus energético de la célula.
- En células hipóxicas (privadas de oxígeno), un inhibidor proteico bloquea la hidrólisis de ATP por la ATP sintasa operando en sentido inverso, impidiendo así una caída drástica en la [ATP].
- Las respuestas de adaptación a la hipoxia, a través de HIF-1, hacen más lenta la transferencia de electrones a la cadena respiratoria y modifican el Complejo IV para que actúe de manera más eficiente en condiciones de baja concentración de oxígeno.
- Las concentraciones de ATP y ADP marcan la velocidad de transferencia electrónica a través de la cadena respiratoria, vía una serie de controles entrelazados sobre la respiración, la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico.

19.4 Las mitocondrias en la termogénesis, síntesis de esteroides y apoptosis

Aunque la producción de ATP es una función central de las mitocondrias, estos orgánulos tienen otras funciones que en tejidos específicos o en circunstancias específicas también son cruciales. En el tejido adiposo, las mitocondrias generan calor para proteger órganos vitales de la baja temperatura ambiente; en las glándulas suprarrenales y en las gónadas, las mitocondrias son el sitio de la síntesis de hormonas esteroideas, y en la mayoría de tejidos son participantes clave en la apoptosis (muerte celular programada).

Las mitocondrias desacopladas del tejido adiposo marrón producen calor

Hemos visto anteriormente que la respiración se hace más lenta cuando la célula tiene un suministro adecuado de ATP. Existe una excepción notable e instructiva a esta regla general. En la mayoría de mamíferos, incluido el ser humano, los recién nacidos tienen un tipo de tejido adiposo denominado **tejido adiposo marrón** (**BAT**; p. 917) en el que la oxidación de combustibles no sirve para producir ATP sino para generar calor y mantener caliente al recién nacido. Este tejido adiposo especializado es marrón debido a la presencia de grandes cantidades de mitocondrias y, por consiguiente, de citocromos cuyos grupos hemo absorben fuertemente la luz visible.

Las mitocondrias del tejido adiposo marrón son iguales que las demás mitocondrias de otras células de mamíferos en todos los aspectos, a excepción de que tienen una proteína particular en su membrana interna. La **termogenina,** llamada también **proteína desacoplante** (producto del gen *UCP1*), proporciona un paso para que los protones vuelvan a la matriz sin pasar por el complejo F_oF_1 **(Fig. 19–34)**. El resultado de este cortocircuito de protones es que la energía de oxidación no se conserva mediante la formación de ATP, sino que se disipa en forma de calor que contribuye al mantenimiento de la temperatura corporal (véase la Fig. 23–17). Los animales hibernantes también dependen de las mitocondrias desacopladas del BAT para generar calor durante sus largos períodos de letargo (véase el Recuadro 17–1). Volveremos al papel de la termogenina cuando discutamos la regulación de la masa corporal en el Capítulo 23 (pp. 931–932).

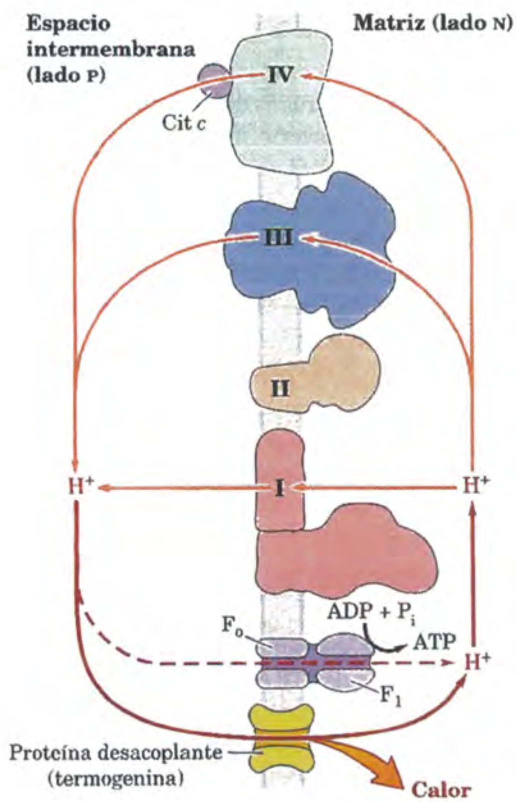


FIGURA 19–34 Generación de calor por mitocondrias desacopladas. La proteína desacoplante (termogenina) de las mitocondrias del tejido adiposo marrón, al proporcionar una ruta alternativa para que los protones vuelvan a entrar en la matriz mitocondrial, hace que la energía conservada por el bombeo de protones se disipe en forma de calor.

Las P-450 oxigenasas mitocondriales catalizan las hidroxilaciones de esteroides

La mitocondria es el sitio de reacciones biosintéticas que producen hormonas esteroideas, entre ellas las hormonas sexuales, los glucocorticoides, los mineralocorticoides y la hormona de la vitamina D. Estos compuestos se sintetizan a partir del colesterol o un esterol relacionado en una serie de hidroxilaciones catalizadas por enzimas de la familia del **citocromo P-450,** que poseen todos ellos un grupo hemo crítico (su absorción a 450 nm da el nombre a esta familia). En las reacciones de hidroxilación se incorpora un átomo del oxígeno molecular al sustrato, mientras que el segundo átomo se reduce a H_2O.

$$R{-}H + O_2 + NADPH \longrightarrow R{-}OH + H_2O + NADP^+$$

Existen docenas de enzimas P-450, situados todos ellos en la membrana mitocondrial interna con su sitio catalítico expuesto a la matriz. Las células esteroidogénicas están rellenas de mitocondrias especializadas en la síntesis de esteroides; las mitocondrias son algo mayores que las de otros tejidos y tienen membranas internas más extensas y replegadas **(Fig. 19–35)**.

La ruta del flujo electrónico en el sistemas P-450 mitocondrial es complejo y en él intervienen una flavoproteína y una proteína ferro-sulfurada que transporta electrones desde el NADPH al hemo del P-450 **(Fig. 19–36)**. La estructura detallada de un enzima P-450 le confiere su especificidad de sustrato, y su grupo hemo, que interacciona directamente con el O_2, sostiene la actividad catalítica compartida por todos los enzimas P-450.

En el retículo endoplasmático de los hepatocitos se encuentra otra gran familia de enzimas P-450. Estos enzimas catalizan reacciones similares a las reacciones de los P-450 mitocondriales, pero entre sus sustratos se incluye una gran variedad de compuestos hidrofóbicos, muchos de los cuales son **xenobióticos,** compuestos que no se encuentran en la naturaleza pero que se sintetizan industrialmente. Los enzimas P-450

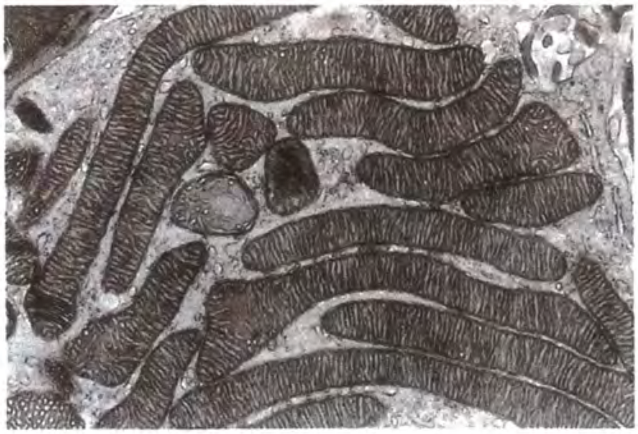


FIGURA 19–35 Mitocondrias de la glándula suprarrenal, especializadas en la síntesis de esteroides. Tal como se ven en esta micrografía electrónica de una sección fina de la glándula suprarrenal, las mitocondrias son abundantes y tienen crestas extensas, lo que proporciona una gran superficie para los enzimas P-450 de la membrana interna.

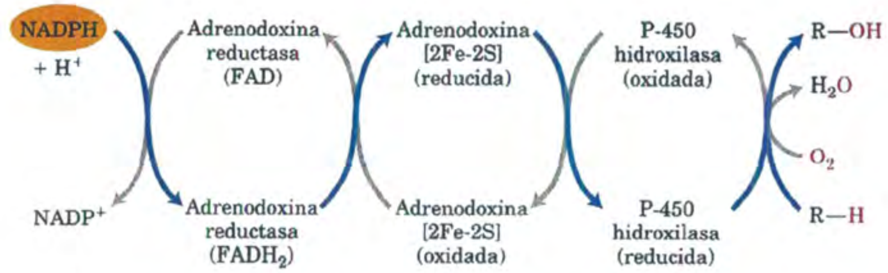


FIGURA 19–36 Ruta del flujo de electrones en las reacciones del citocromo P-450 mitocondrial en la glándula suprarrenal. Se transfieren dos electrones desde el NADH a la adrenodoxina reductasa, una flavoproteína que contiene FAD, la cual pasa los electrones, de uno en uno, a la adrenodoxina, una pequeña proteína 2Fe-2S soluble. La adrenodoxina pasa electrones individuales a la citocromo P-450 hidroxilasa, que interacciona directamente con el O_2 y el sustrato (R–H) formando los productos H_2O y R–OH.

del RE tienen especificidades de sustrato muy amplias y solapadas. La hidroxilación de los compuestos hidrofóbicos los hace más hidrosolubles, con lo que pueden ser eliminados por los riñones y excretados en la orina. Entre los sustratos de estas P-450 oxigenasas se encuentran muchos medicamentos. El metabolismo por parte de los enzimas P-450 limita el tiempo de vida del medicamento en el torrente circulatorio y sus efectos terapéuticos. Los humanos difieren en su dotación genética de enzimas P-450 en el RE y en la extensión en la que se han inducido ciertos enzimas P-450, como por ejemplo debido a una historia de consumo de alcohol. En principio, por tanto, la genética y la historia personal de un individuo podrían figurar en la determinación de la dosis terapéutica de un medicamento; en la práctica esta adaptación precisa de la dosificación no es aún factible económicamente, si bien podría llegar a serlo. ■

Las mitocondrias son vitales en el inicio de la apoptosis

La **apoptosis,** también llamada **muerte celular programada,** es un proceso mediante el que células individuales mueren por el bien del organismo (por ejemplo, en el transcurso de un desarrollo embrionario normal), al tiempo que el organismo conserva los componentes moleculares de la célula (aminoácidos, nucleótidos, etc.). La apoptosis pede ser provocada por una señal externa que actúa sobre un receptor de la membrana plasmática o mediante procesos internos tales como lesiones en el DNA, una infección vírica, estrés oxidativo por la acumulación de ROS u otro estrés tal como el choque térmico.

Las mitocondrias juegan un papel crucial en el desecadenamiento de la apoptosis. Cuando un agente estresante da la señal para la muerte celular, una consecuencia temprana es un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa que permite la salida del citocromo *c* del espacio intermembrana al citosol **(Fig. 19–37).** El aumento de la permeabilidad se debe a la apertura del **complejo del poro de transición de la permeabilidad (PTPC),** una proteína con múltiples subunidades de la membrana externa; su apertura y cierre están afectados por varias proteínas que estimulan o suprimen la

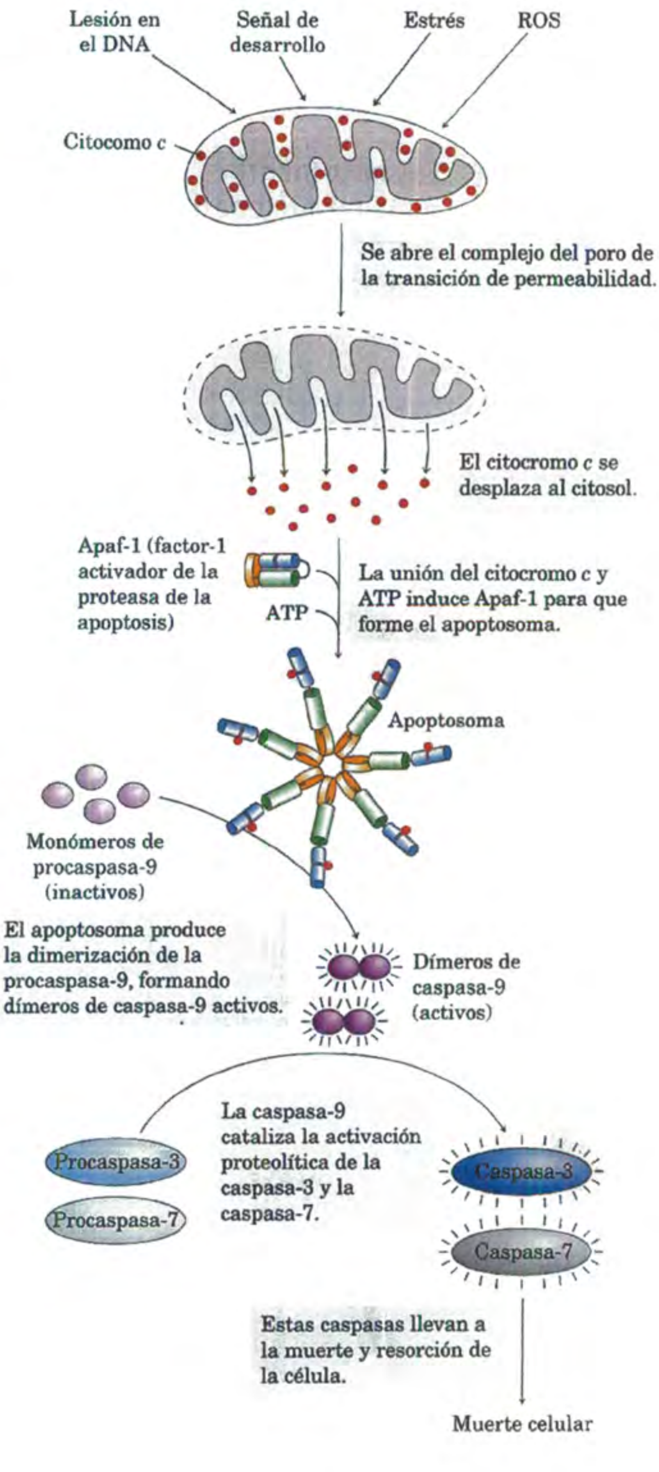


FIGURA 19–37 Papel del citocromo *c* en la apoptosis. El citocromo *c* es una pequeña proteína mitocondrial soluble, localizada en el espacio intermembrana, que transporta electones entre los Complejos III y IV durante la respiración. En un papel totalmente diferente, tal como se describe aquí, actúa como desencadenante de la apoptosis al estimular la activación de una familia de proteasas denominadas caspasas.

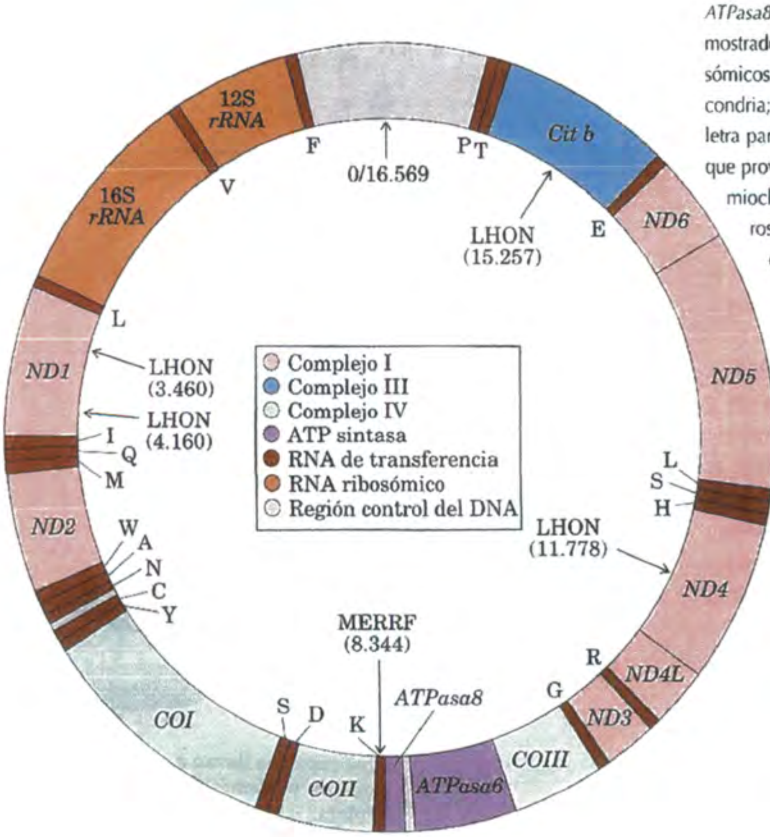
apoptosis. Cuando se libera al citosol, el citocromo *c* interacciona con monómeros de la proteína **Apaf-1 (factor 1 activador de la proteasa de la apoptosis),** lo que lleva a la formación de un **apoptosoma** compuesto por siete moléculas de Apaf-1 y siete moléculas de citocromo *c*. El apoptosoma proporciona la plataforma sobre la que la proteasa procaspasa-9 se activa a caspasa-9, un miembro de una familia de proteasas muy específicas (las **caspasas**) implicadas en la apoptosis. Comparten un residuo *Cys* crítico en su sitio activo y todas cortan proteínas sólo en el lado carboxilo terminal de residuos *Asp*; de ahí el nombre de "caspasas". La caspasa-9 activada inicia una cascada de activaciones proteolíticas, con una caspasa actuando sobre una segunda caspasa y ésta, a su vez, sobre una tercera, y así sucesivamente (véase la Fig. 12–51). (Esta función del citocromo *c* en la apoptosis es un caso claro de segunda actividad "tenue", "moonlighting", en la que una proteína tiene dos funciones diferentes en la célula; véase el Recuadro 16–1).

RESUMEN 19.4 Las mitocondrias en la termogénesis, síntesis de esteroides y apoptosis

- En el tejido adiposo marrón de los recién nacidos, la transferencia de electrones está desacoplada de la síntesis de ATP, por lo que la energía de la oxidación de los combustibles se disipa en forma de calor metabólico.
- Los pasos de reacciones de hidroxilación en la síntesis de las hormonas esteroideas en los tejidos esteroidogénicos (glándula suprarrenal, gónadas, hígado y riñón) tienen lugar en mitocondrias especializadas.
- El citocromo *c* mitocondrial, liberado al citosol, participa en la activación de la caspasa-9, una de las proteasas que intervienen en la apoptosis.

19.5 Genes mitocondriales: su origen y efectos de mutaciones

Las mitocondrias contienen su propio genoma, una molécula circular de DNA de doble cadena (mtDNA). Cada una de las cientos o miles de mitocondrias de una célula típica tiene unas cinco copias de este genoma. Hay 37 genes (16.569 pb) en el cromosoma mitocondrial humano **(Fig. 19–38),** incluidos 13 que codifican subunidades de proteínas de la cadena respiratoria (Tabla 19–6); los restantes genes codifican moléculas de rRNA y tRNA esenciales para la maquinaria sintetizadora de proteínas de la mitocondria. La gran mayoría de proteínas mitocondriales, unos 900 tipos diferentes, están codificadas por genes nucleares, se sintetizan en ribosomas citoplasmáticos y se importan y organizan seguidamente dentro de la mitocondria (Capítulo 27).



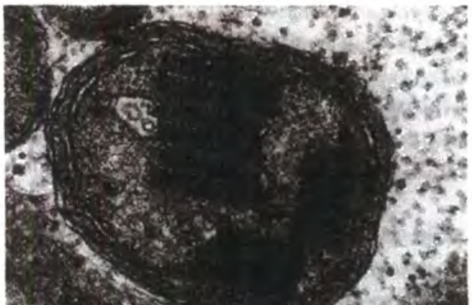


FIGURA 19–38 Genes mitocondriales y mutaciones. (a) Mapa del DNA mitocondrial humano en el que se muestran los genes que codifican proteínas del Complejo I, la NADH deshidrogenasa (*ND1* a *ND6*); el citocromo *b* del Complejo III (*cit b*); las subunidades de la citocromo oxidasa (Complejo IV) (*COI* a *COIII*), y dos subunidades de la ATP sintasa (*ATPasa6* y *ATPasa8*). Los colores de los genes corresponden a los colores de los complejos mostrados en la Fig. 19–7. También se muestran aquí los genes de los RNA ribosómicos (*rRNA*) y de una serie de RNA de transferencia específicos de la mitocondria; la especificidad de los tRNA está indicada mediante el código de una letra para los aminoácidos. Las flechas indican las posiciones de mutaciones que provocan la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) y la epilepsia mioclónica y la enfermedad de las fibras rojas rasgadas (MERRF). Los números en paréntesis indican la posición de los nucleótidos alterados (el nucleótido número 1 está en la parte superior del círculo y la numeración transcurre en sentido contrario a las agujas del reloj). **(b)** Micrografía electrónica de una mitocondria anormal del músculo de un individuo con MERRF mostrando las inclusiones paracristalinas de proteína que a veces están presentes en la mitocondrias mutantes.

TABLA 19–6 Proteínas respiratorias codificadas en el cromosoma mitocondrial humano

Complejo	Número total de subunidad	Número de subunidades codificadas en el DNA mitocondrial
I NADH deshidrogenasa	43	7
II Succinato deshidrogenasa	4	0
III Ubiquinona: citocromo *c* oxidorreductasa	11	1
IV Citocromo oxidasa	13	3
V ATP sintasa	8	2

Las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias endosimbióticas

La existencia del DNA mitocondrial, ribosomas y tRNA apoya la hipótesis sobre el origen endosimbiótico de las mitocondrias (véase la Fig. 1–36) que supone que los primeros organismos capaces de metabolismo aeróbico, incluida la producción de ATP ligada a la respiración, eran bacterias. Los eucariotas primitivos que vivían anaeróbicamente (por fermentación) adquirieron la capacidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa cuando establecieron una relación simbiótica con bacterias que vivían en su citosol. Tras mucha evolución y traslado de muchos genes bacterianos al núcleo del eucariota "huésped", las bacterias endosimbióticas se transformaron finalmente en mitocondrias.

Esta hipótesis supone que las bacterias primitivas que vivían libremente tenían la maquinaria enzimática para la fosforilación oxidativa y predice que sus descendientes bacterianos modernos han de tener cadenas respiratorias muy similares a las de los eucariotas modernos. Ello es así. Las bacterias aeróbicas llevan a cabo la transferencia de electrones ligada a NAD desde sustratos al O_2 acoplada a la fosforilación del ADP citosólico. Las deshidrogenasas están localizadas en el citosol bacteriano, y la cadena respiratoria en la membrana plasmática. Los transportadores electrónicos translocan protones al exterior a través de la membrana plasmática de modo concomitante con la transferencia de electrones al O_2. Bacterias tales como *Escherichia coli* tienen complejos F_oF_1 en sus membranas plasmáticas; la porción F_1 sobresale en el citosol y cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i a medida que los protones fluyen de nuevo hacia el interior de la célula a través del canal protónico de F_o.

La salida de protones ligada a la respiración a través de la membrana plasmática bacteriana también suministra la fuerza motora para otros procesos. Ciertos sistemas de transporte bacterianos llevan a cabo la captación de nutrientes extracelulares (lactosa, por ejemplo) contra un gradiente de concentración en cotransporte paralelo con protones (véase la Fig. 11–42). Y la moción rotacional de los flagelos bacterianos la proporcionan "turbinas de protones", motores rotatorios moleculares impulsados no por el ATP sino directamente por el potencial electroquímico transmembrana generado por el bombeo protónico ligado a la respiración (**Fig. 19–39**). Parece probable que los mecanismos quimiosmóticos aparecieron pronto, antes de la aparición de los eucariotas.

En el DNA mitocondrial se acumulan mutaciones a lo largo de la vida del organismo

La cadena respiratoria es el principal productor de especies de oxígeno reactivas en las células, por lo que el contenido mitocondrial, incluido el genoma mitocondrial, está sujeto a la máxima exposición, y a las lesiones, por ROS. Además, el sistema de replicación mitocondrial es menos efectivo que el sistema nuclear en la corrección de errores producidos durante la replicación así como en la reparación de las lesiones del DNA. Como consecuencia de estos dos factores, los defectos en el mtDNA se acumulan a lo largo del tiempo. Una teoría sobre el envejecimiento es que esta acumulación gradual de defectos con la edad es la causa principal de muchos de los "síntomas" del envejecimiento, entre los que se cuentan por ejemplo una debilitación progresiva de los músculos esquelético y cardíaco.

Una característica exclusiva de la herencia mitocondrial es la variación entre células individuales, y entre un organismo individual y otro, en los efectos de una mutación en el mtDNA. Una célula típica tiene cientos o millares de mitocondrias, cada

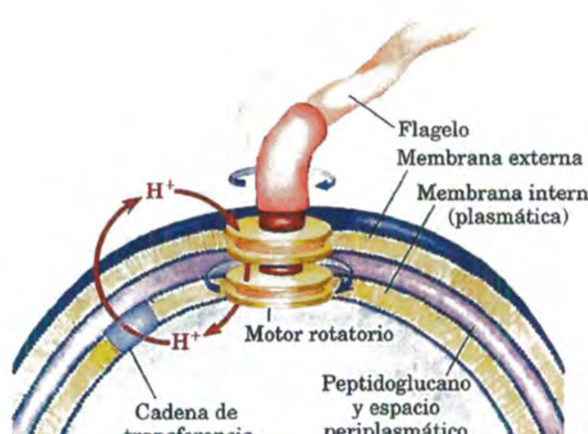


FIGURA 19–39 Rotación de los flagelos bacterianos por la fuerza protón-motriz. El eje y anillos de la base del flagelo constituyen un motor rotatorio que se ha denominado una "turbina de protones". Los protones lanzados al exterior por la transferencia electrónica fluyen de nuevo a la célula a través de la turbina, haciendo que gire el eje del flagelo. Este movimiento difiere fundamentalmente del movimiento del músculo o de los flagelos y cilios eucarióticos en los que la hidrólisis de ATP es la fuente de energía.

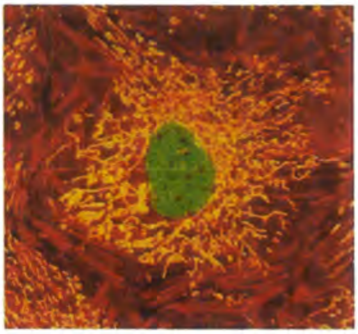


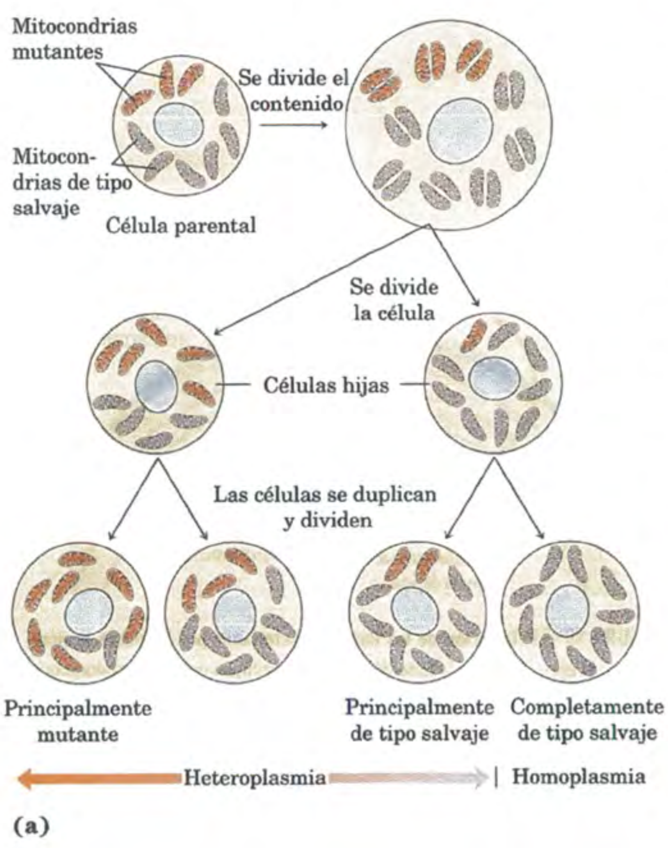
FIGURA 19–40 Cada célula contiene muchas mitocondrias Una célula animal típica tiene cientos o miles de mitocondrias; una fracción de las mismas pueden contener genomas con mutaciones que afectan a la función mitocondrial. Esta célula epitelial de riñón ovino se cultivó en el laboratorio, se fijó y tiñió con sondas fluorescentes que muestran las mitocondrias doradas, los filamentos de actina rojos y los núcleos verdes cuando se observan al microscopio de fluorescencia.

una con su propia copia del genoma **(Fig. 19–40)**. Suponga que en un organismo hembra se produce una lesión en un genoma mitocondrial de una célula germinal de la que se desarrollan oocitos, de modo que la célula germinal contiene principalmente mitocondrias de tipo salvaje, pero también hay una mitocondria con un gen mutante. Durante la maduración del oocito, a medida que esta célula germinal y sus descendientes se dividen repetidamente, la mitocondria defectuosa se replica y su progenie, todas defectuosas, se distribuyen al azar en las células hijas. Finalmente, las células huevo maduras contienen diferentes proporciones de la mitocondria defectuosa. Cuando se fertiliza una célula huevo y experimenta la multitud de divisiones del desarrollo embrionario, las células somáticas resultantes difieren en su proporción de mitocondrias mutantes **(Fig. 19–41a)**. (Recuerde que todas las mitocondrias de un embrión en desarrollo proceden del huevo, ninguna de la célula espermática.) Esta **heteroplasmia** (en contraposición con la **homoplasmia,** en la que cada genoma mitocondrial es el mismo en todas las células) da lugar a fenotipos mutantes con diversos grados de gravedad. Las células (y tejidos) que contienen mayoritariamente mitocondrias de tipo salvaje tienen el fenotipo salvaje; son esencialmente normales. Otras células heteroplásmicas tendrán fenotipos intermedios, algunas casi normales, otras anormales (con una elevada proporción de mitocondrias mutantes) (Fig. 19–41b). Si el fenotipo está asociado con una enfermedad (véase más adelante), los individuos con la misma mutación del mtDNA pueden tener síntomas de gravedad diferente, según el número y distribución de las mitocondrias afectadas.

Algunas mutaciones en los genomas mitocondriales producen enfermedades

Cada vez hay más enfermedades humanas que se pueden atribuir a mutaciones de los genes mitocondriales que reducen la capacidad celular para producir ATP. Algunos tejidos y tipos celulares (neuronas, miocitos tanto del músculo esquelético como del cardíaco y las células β del páncreas) toleran menos que otras la disminución en la producción de ATP, por lo que se ven más afectadas por mutaciones de las proteínas mitocondriales.

Un grupo de enfermedades genéticas, conocidas como **encefalomiopatías mitocondriales,** afectan principalmente al cerebro y al músculo esquelético. Estas enfermedades se here-



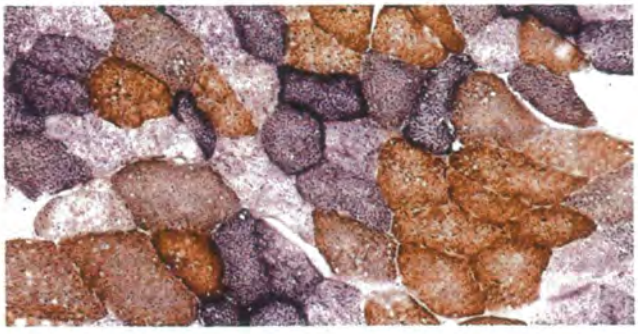


FIGURA 19–41 Heteroplasmia en los genomas mitocondriales **(a)** Cuando se fertiliza una célula huevo madura, todas las mitocondrias de la célula diploide (zigoto) resultante son de origen materno; nunca proceden del esperma. Si una parte de las mitocondrias maternas tienen un gen mutante, la distribución al azar de las mitocondrias durante las divisiones celulares posteriores producen algunas células hijas que contienen mayoritariamente mitocondrias mutantes, algunas con mitocondrias mayoritariamente de tipo salvaje y algunas entre un extremo y el otro; así, las células hijas muestran diversos grados de heteroplasmia. **(b)** Grados diferentes de heteroplasmia producen diferentes fenotipos celulares. Esta sección de tejido muscular humano es de un individuo con citocromo oxidasa defectuosa. Las células se han teñido de modo que las células de tipo salvaje sean azules y las células con citocromo oxidasa mutante sean marrones. Tal como muestra la micrografía, diferentes células del mismo tejido están afectadas en grados diferentes por la mutación mitocondrial.

dan invariablemente de la madre, ya que, como se ha dicho anteriormente, todas las mitocondrias del embrión en desarrollo provienen del huevo de la madre. La rara enfermedad **neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)** afecta al sistema nervioso central, incluidos los nervios ópticos, causando pérdida de la visión bilateral al principio de la adolescencia. Un solo cambio de base en el gen mitocondrial *ND4* (Fig. 19–38a) cambia un residuo Arg por una His en un polipéptido del Complejo I, siendo el resultado que las mitocondrias son parcialmente defectuosas en la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona. Aunque estas mitocondrias son capaces de producir algo de ATP por transferencia de electrones desde el succinato, aparentemente no pueden suministrar ATP en cantidad suficiente para mantener el metabolismo neuronal, que es muy activo. Un resultado es la lesión del nervio óptico que conlleva ceguera. Un solo cambio de base en el gen mitocondrial del citocromo *b*, un componente del Complejo III, también produce LHON, lo que demuestra que la patología de la enfermedad es el resultado de una reducción general de la función mitocondrial y no sólo de un defecto en la transferencia electrónica a través del Complejo I.

Una mutación (en *ATP6*) que afecta el poro de protones de la ATP sintasa produce velocidades bajas de síntesis de ATP, mientras que la cadena respiratoria permanece intacta. El estrés oxidativo debido al suministro continuo de electrones desde el NADH aumenta la producción de ROS y las lesiones causadas por ROS a las mitocondrias establece un círculo vicioso. La mitad de individuos con este gen mutante mueren a los pocos días o meses después del nacimiento.

La **enfermedad de la epilepsia mioclónica y de la fibra roja rota (MERRF)** está producida por una mutación en el gen mitocondrial que codifica un tRNA específico para lisina ($tRNA^{Lys}$). Esta enfermedad, caracterizada por sacudidas musculares incontrolables, aparentemente es el resultado de la producción defectuosa de varias de las proteínas sintetizadas utilizando tRNA mitocondriales. Las fibras del músculo esquelético de los individuos con MERRF tienen mitocondrias con formas anormales que a veces contienen estructuras paracristalinas (Fig. 19–38b). Se cree que otras mutaciones en los genes mitocondriales son las responsables del debilitamiento muscular progresivo que caracteriza la miopatía mitocondrial, así como del aumento de tamaño y deterioro del músculo cardíaco en la cardiomiopatía hipertrófica. Según una hipótesis sobre los cambios progresivos que acompañan el envejecimiento, la acumulación de mutaciones en el mtDNA durante toda una vida de exposición a agentes que lo dañan, tales como $\cdot O_2^-$, tiene como consecuencia que la mitocondria no pueda aportar suficiente ATP para que la función celular sea normal. Mutaciones en cualquiera de los 900 genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales también pueden tener como resultado enfermedades mitocondriales. ■

Defectos en las mitocondrias de las células β pancreáticas pueden ser causa de diabetes

El mecanismo que regula la liberación de insulina de las células β pancreáticas dependen de la concentración de ATP en esas células. Cuando la concentración de glucosa sanguínea es elevada, las células β captan glucosa que oxidan mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, aumentando la [ATP] por encima de un nivel umbral **(Fig. 19–42)**. Cuando la [ATP] excede este umbral, se cierra un canal de K^+ regulado por ATP de la membrana plasmática, despolarizando la membrana y desencadenando la liberación de insulina (Fig. 23–28). Las células β pancreáticas con defectos en la fosforilación oxidativa no pueden aumentar la [ATP] por encima del umbral, con lo que el déficit en la liberación de insulina produce diabetes. Por ejemplo, defectos en el gen de la glucoquinasa, el isozima hexoquinasa IV presente en las células β, da lugar a una forma rara de diabetes, MODY2 (véase el Recuadro 15–3); la baja actividad de la glucoquinasa impide la generación de una [ATP] por encima del umbral, lo que bloquea la secreción de insulina. Mutaciones en los genes el $tRNA^{Lys}$ o $tRNA^{Leu}$ mitocondriales también impiden la producción mitocondrial de ATP, por lo que la diabetes mellitus tipo 2 es frecuente en individuos con estos defectos (aunque estos casos sólo constituyen una pequeña fracción de todos los casos de diabetes).

Cuando la nucleótido de nicotinamida transhidrogenasa, que es parte de la defensa mitocondrial contra las ROS (véase la Fig. 19–18) es genéticamente defectuosa, la acumulación de ROS daña la mitocondria, enlenteciendo la producción de ATP y bloqueando la liberación de insulina por las células β (Fig. 19–42). Las lesiones causadas por ROS, entre las que se encuentran las del mtDNA, también pueden estar en la base de otras enfermedades humanas; hay algunas pruebas de su intervención en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington y en el fallo cardíaco, así como en el envejecimiento. ■

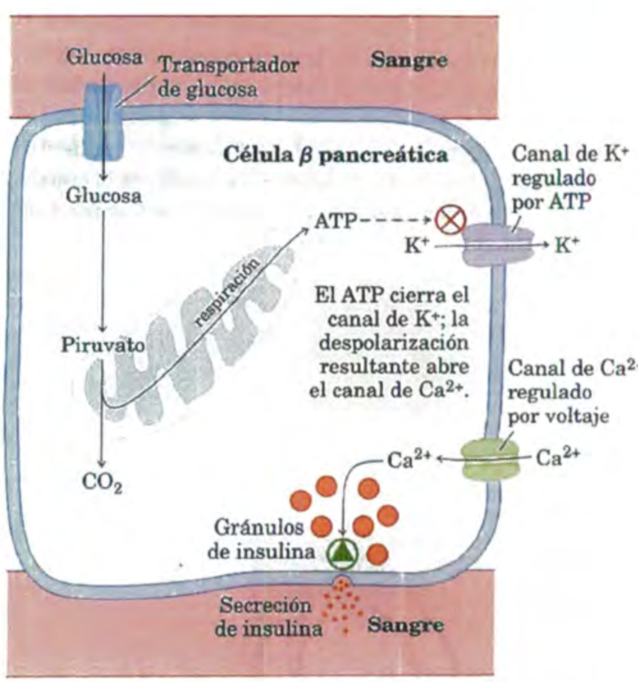


FIGURA 19–42 La fosforilación oxidativa defectuosa en las células β pancreáticas bloquean la secreción de insulina Normalmente, cuando aumenta la glucosa sanguínea, aumenta la producción de ATP en las células β. El ATP, al bloquear los canales de K^+, despolariza la membrana plasmática, abriendo así los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje. La entrada de Ca^{2+} resultante desencadena la exocitosis de vesículas secretoras que contienen insulina, liberando dicha insulina. Cuando la fosforilación oxidativa es defectuosa en las células β, la [ATP] nunca es suficiente para desencadenar este proceso, con lo que no se libera insulina.

RESUMEN 19.5 Genes mitocondriales: su origen y efectos de mutaciones

- Una pequeña proporción de las proteínas mitocondriales humanas, 13 en total, están codificadas en el genoma mitocondrial y se sintetizan en el interior de la mitocondria. Unas 900 proteínas mitocondriales están codificadas en genes nucleares y se importan a la mitocondria después de su síntesis.
- Las mitocondrias surgieron de bacterias aeróbicas que establecieron una relación simbiótica con organismos eucariotas primitivos.
- En el genoma mitocondrial se acumulan mutaciones a lo largo de la vida del organismo. Mutaciones en los genes que codifican componentes de la cadena respiratoria, ATP sintasa y el sistema de eliminación de ROS, e incluso en los genes de tRNA, producen diversas enfermedades humanas que a menudo afectan con mayor gravedad al músculo, al corazón, a las células β pancreáticas y al cerebro.

FOTOSÍNTESIS: CAPTACIÓN DE LA ENERGÍA LUMINOSA

Pasamos ahora a otra secuencia de reacciones en las que se acopla el flujo de electrones a la síntesis de ATP: la fosforilación impulsada por la luz. La captación de energía solar por organismos fotosintéticos y su conversión en la energía química de compuestos orgánicos reducidos es la fuente última de casi toda la energía biológica. Los organismos fotosintéticos y los heterótrofos viven en un estado estacionario equilibrado en la biosfera **(Fig. 19–43)**. Los organismos fotosintéticos atrapan la energía solar formando ATP y NADPH, que utilizan como fuentes de energía para fabricar glúcidos y otros compuestos orgánicos a partir de CO_2 y H_2O; de forma simultánea desprenden O_2 a la atmósfera. Los heterótrofos aeróbicos (los humanos, por ejemplo, así como las plantas durante los períodos oscuros) utilizan el O_2 así formado para degradar los productos orgánicos ricos en energía de la fotosíntesis a CO_2 y H_2O, generando ATP. El CO_2 vuelve a la atmósfera para ser utilizado de nuevo por los organismos fotosintéticos. De este modo la energía solar proporciona la fuerza motriz para la ciclación continua del CO_2 y O_2 a través de la biosfera y proporciona los sustratos reducidos (combustibles tales como la glucosa) de los que dependen los organismos no fotosintéticos.

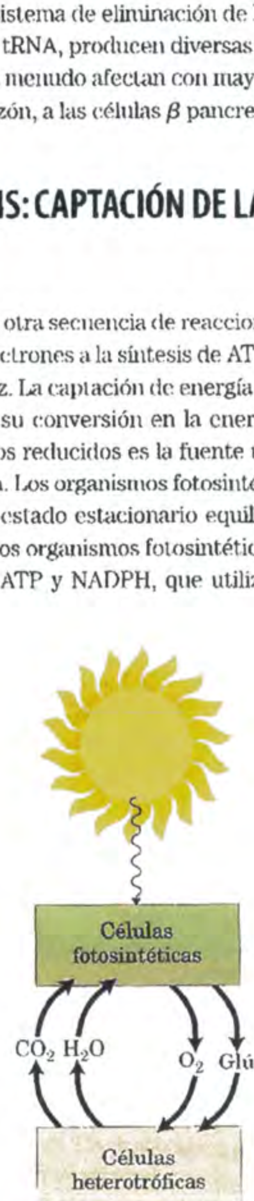


FIGURA 19–43 La energía solar es la fuente fundamental de toda la energía biológica. Los organismos fotosintéticos utilizan la energía de la luz solar para fabricar glucosa y otros productos orgánicos que son utilizados por las células heterotróficas como fuentes de energía y de carbono.

La fotosíntesis se da en diversidad de bacterias y eucariotas unicelulares (algas), así como en las plantas vasculares. Aunque los procesos en estos organismos difieran en detalle, la base de los mecanismos es notablemente similar, y una gran parte de nuestro conocimiento sobre la fotosíntesis en plantas vasculares procede del estudio de organismos más simples. La ecuación global de la fotosíntesis en las plantas vasculares describe una reacción de oxidación-reducción en la que el H_2O cede electrones (en forma de hidrógeno) para la reducción del CO_2 a glúcido (CH_2O):

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{luz}} O_2 + (CH_2O)$$

19.6 Características generales de la fotofosforilación

A diferencia del NADH (el principal dador de electrones de la fosforilación oxidativa), el H_2O es un dador electrónico pobre; su potencial de reducción estándar es 0,816 V, en comparación con –0,320 V para el NADH. La fotofosforilación difiere de la fosforilación oxidativa en que necesita el aporte de energía en forma de luz para *crear* un buen dador electrónico. En la fotofosforilación los electrones fluyen a través de una serie de transportadores ligados a membrana entre los que se cuentan citocromos, quinonas y proteínas ferro-sulfuradas, al tiempo que se bombean protones a través de la membrana para crear un potencial electroquímico. La transferencia de electrones y el bombeo de protones están catalizados por complejos de membrana homólogos en estructura y función al complejo III de la mitocondria. El potencial electroquímico que producen es la fuerza motriz para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i, catalizada por un complejo ATP sintasa ligado a membrana muy similar al que funciona en la fosforilación oxidativa.

La fotosíntesis en plantas abarca dos procesos: las **reacciones dependientes de la luz,** o **reacciones luminosas,** que sólo tienen lugar cuando se iluminan las plantas, y las **reacciones de asimilación de carbono** (o **reacciones de fijación de carbono**), también denominadas inadecuadamente reacciones oscuras, y que son impulsadas por productos de las reacciones luminosas **(Fig. 19–44)**. En las reacciones luminosas se absorbe energía luminosa por la clorofila y otros pigmentos de las células fotosintéticas, conservándola en forma de ATP y NADPH; simultáneamente se elimina O_2. En las reacciones de asimilación de carbono se utilizan ATP y NADPH para reducir el CO_2 y formar triosas fosfato, almidón y sacarosa, y

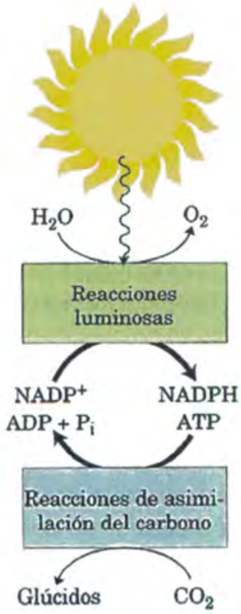


FIGURA 19–44 Las reacciones luminosas de la fotosíntesis generan NADPH y ATP ricos en energía a expensas de la energía solar. NADPH y ATP se utilizan en las reacciones de asimilación de carbono, que tienen lugar en la luz o en la oscuridad, para reducir CO_2 y formar triosas y otros compuestos más complejos (tales como la glucosa) derivados de las triosas.

otros productos derivados de los mismos. En este capítulo nos ocuparemos solamente de las reacciones dependientes de la luz que conducen a la síntesis de ATP y NADPH. La reducción del CO_2 se describe en el Capítulo 20.

La fotosíntesis en plantas tiene lugar en los cloroplastos

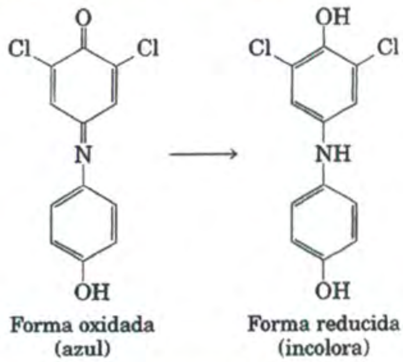
En las células eucarióticas fotosintéticas tanto las reacciones dependientes de la luz como las de fijación de carbono tienen lugar en los cloroplastos **(Fig. 19–45)**, orgánulos intracelulares limitados por una membrana que son variables en forma y tienen generalmente unos pocos micrómetros de diámetro. Al igual que las mitocondrias, están rodeados de dos membranas, una membrana externa que es permeable a pequeñas moléculas e iones y una membrana interna que encierra el compartimiento interno. Este compartimiento contiene muchas vesículas o sacos aplanados y rodeados de membrana llamados **tilacoides,** que están normalmente ordenados en forma de pilas denominadas **grana** (Fig. 19–45b). Los pigmentos fotosintéticos y los complejos enzimáticos que llevan a cabo las reacciones luminosas y la síntesis de ATP están incrustados en las membranas de los tilacoides (comúnmente denominadas **lamelas**). El **estroma** (la fase acuosa encerrada por la membrana interna) contiene la mayoría de los enzimas requeridos para las reacciones de asimilación de carbono.

La luz impulsa un flujo de electrones en los cloroplastos

En 1937, Robert Hill descubrió que cuando se iluminan extractos de hoja que contienen cloroplastos, (1) se desprende O_2 y (2) se reduce un aceptor de electrones no biológico añadido al medio, según la **reacción de Hill:**

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{luz}} 2AH_2 + O_2$$

donde A es el aceptor de electrones artificial o **reactivo de Hill**. Un reactivo de Hill, el colorante 2,6-diclorofenolindofenol, en su forma oxidada (A) es azul, siendo incoloro en su forma reducida (AH_2); así es fácil seguir la reacción.



Diclorofenolindofenol

Cuando se iluminaba el extracto de hojas suplementado con el colorante, el color azul se volvía incoloro al tiempo que se desprendía O_2. En la oscuridad ni se desprendía O_2 ni se reducía el colorante. Ésta fue la primera prueba de que la energía lumi-

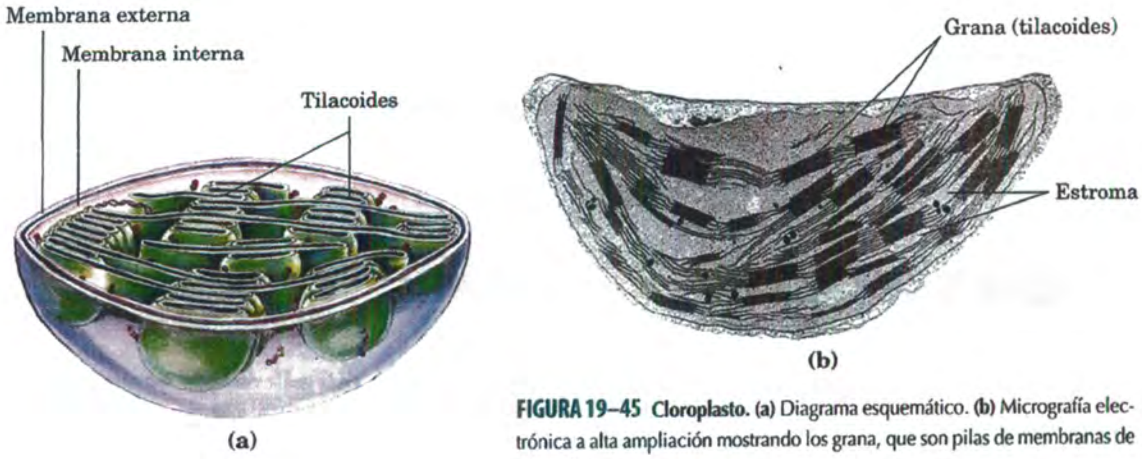


FIGURA 19–45 Cloroplasto. **(a)** Diagrama esquemático. **(b)** Micrografía electrónica a alta ampliación mostrando los grana, que son pilas de membranas de tilacoides.

nosa absorbida hace que fluyan electrones desde el H_2O a un aceptor electrónico. Además, Hill observó que no se requería CO_2 para esta reacción ni se reducía en estas condiciones a una forma estable; podía disociarse el desprendimiento de O_2 de la reducción del CO_2. Varios años más tarde Severo Ochoa descubrió que el $NADP^+$ es el aceptor electrónico biológico en los cloroplastos, según la ecuación

$$2H_2O + 2NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} 2NADPH + 2H + O_2$$

Para comprender este proceso fotoquímico tenemos que considerar primeramente los efectos de la absorción de la luz sobre la estructura molecular.

RESUMEN 19.6 Características generales de la fotofosforilación

- Las reacciones luminosas de la fotosíntesis son las que dependen directamente de la absorción de la luz; la fotoquímica resultante toma electrones del H_2O y los conduce a través de transportadores unidos a membrana, produciendo NADPH y ATP.
- Las reacciones de asimilación de carbono de la fotosíntesis reducen el CO_2 con electrones del NADPH y energía del ATP.

19.7 Absorción de la luz

La luz visible es radiación electromagnética de longitud de onda entre 400 y 700 nm, que es una pequeña parte del espectro electromagnético **(Fig. 19–46)**, yendo desde el violeta al rojo. La energía de un **fotón** individual (un cuanto de luz) es mayor en el extremo violeta del espectro que en el rojo; longitudes de onda menores (y mayor frecuencia) corresponden a una mayor energía. La energía, E, de un fotón individual viene dada por la ecuación de Planck:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

donde h es la constante de Planck ($6{,}626 \times 10^{-34}$ J·s), ν es la frecuencia de la luz en ciclos/s, c es la velocidad de la luz ($3{,}00 \times 10^8$ m/s) y λ es la longitud de onda en metros. La energía de un fotón de luz visible va desde 150 kJ/einstein para la luz roja a ~300 kJ/einstein para la luz violeta.

EJEMPLO PRÁCTICO 19–2 Energía de un fotón

La luz utilizada por las plantas vasculares tiene una longitud de onda de unos 700 nm. Calcule la energía en un "mol" de fotones (un einstein) de luz de esta longitud de onda y compárela con la energía necesaria para sinttizar un mol de ATP.

Solución: La energía de un fotón individual viene dada por la ecuación de Planck. A una longitud de onda de 700×10^{-9} m, la energía del fotón es

$$\begin{aligned} E &= hc/\lambda \\ &= [(6{,}626 \times 10^{-34}\ \text{J}\cdot\text{s})(3{,}00 \times 10^8\ \text{m/s})]/(7{,}00 \times 10^{-7}\ \text{m}) \\ &= 2{,}84 \times 10^{-19}\ \text{J} \end{aligned}$$

Un einstein de luz es el número de Avogadro ($6{,}022 \times 10^{23}$) de fotones, por lo que la energía de un einstein de fotones a 700 nm viene dada por

$$\begin{aligned} &(2{,}84 \times 10^{-19}\ \text{J/fotón})(6{,}022 \times 10^{23}\ \text{fotones/einstein}) \\ &= 17{,}1 \times 10^4\ \text{J/einstein} \\ &= 171\ \text{kJ/einstein.} \end{aligned}$$

Por tanto, un "mol" de fotones de luz roja tiene unas cinco veces la energía necesaria para producir un mol de ATP a partir de ADP y P_i (30,5 kJ/mol).

Cuando se absorbe un fotón se eleva un electrón de la molécula que lo absorbe (cromóforo) a un nivel energético superior. Esto sucede según un proceso de todo o nada; para ser absorbido, el fotón ha de contener una cantidad de energía (un **cuanto**) que iguale exactamente la energía de la transición electrónica. Una molécula que ha absorbido un fotón se encuentra en un **estado excitado** que, en general, es inestable. Los electrones elevados a orbitales de energía superior usualmente vuelven rápidamente a sus orbitales de menor energía; la molécula excitada vuelve (decae) al **estado basal** estable, dejando ir el cuanto absorbido en forma de luz o calor o utilizándolo para realizar trabajo químico. La luz emitida durante el decaimien-

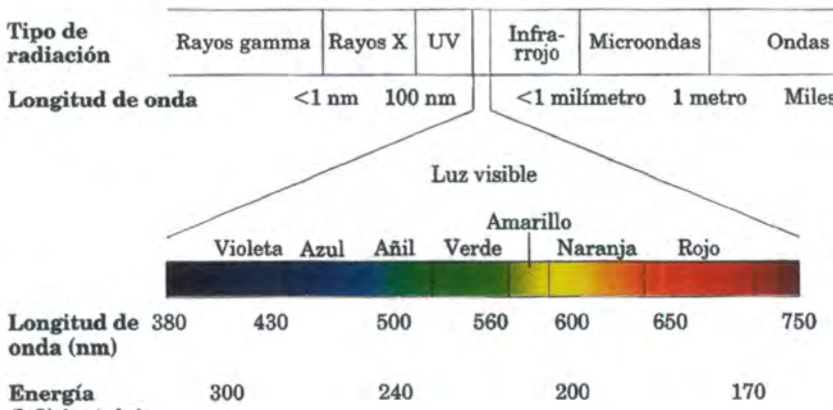


FIGURA 19–46 Radiación electromagnética. Espectro de la radiación electromagnética y energía de los fotones en la gama visible del espectro. Un einstein equivale a $6{,}022 \times 10^{23}$ fotones.

to de las moléculas excitadas (denominada **fluorescencia**) es siempre de una longitud de onda superior (menor energía) que la de la luz absorbida (véase el Recuadro 12–3). Un modo alternativo de decaimiento importante en la fotosíntesis implica la transferencia directa de la energía de excitación desde una molécula excitada a una molécula vecina. De la misma manera que el fotón es un cuanto de energía luminosa, el **excitón** es un cuanto de energía pasada desde una molécula excitada a otra molécula en un proceso denominado **transferencia de excitón.**

Las clorofilas absorben energía luminosa para la fotosíntesis

Los pigmentos más importantes que absorben luz en las membranas de los tilacoides son las **clorofilas,** pigmentos verdes con estructuras policíclicas planas que se parecen a la protoporfirina de la hemoglobina (véase la Fig. 5–1), excepto en que la posición central está ocupada por Mg^{2+} en lugar de Fe^{2+} **(Fig. 19–47)**. Los cuatro átomo de nitrógeno orientados hacia el interior de la clorofila están coordinados con el Mg^{2+}. Todas

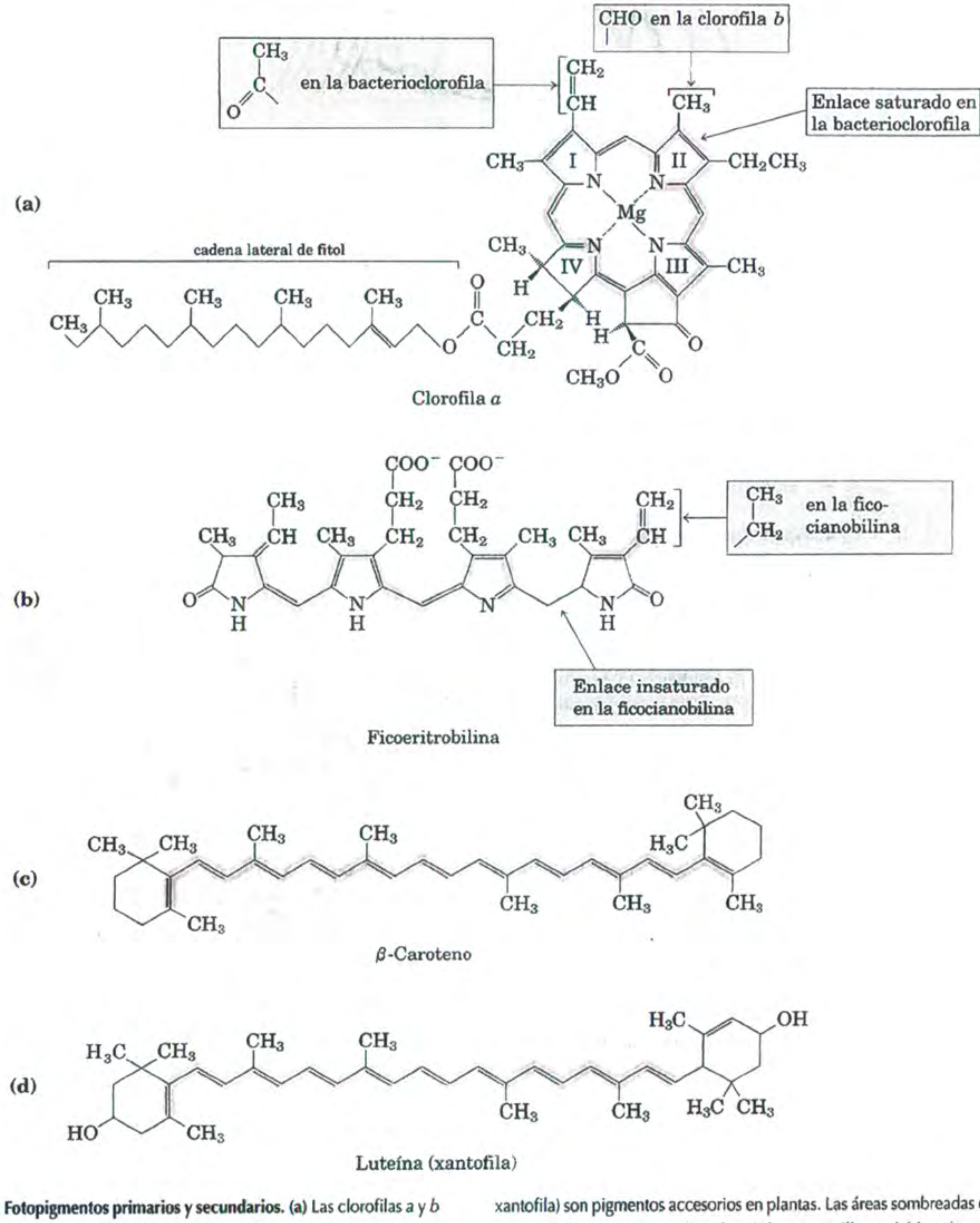


FIGURA 19–47 Fotopigmentos primarios y secundarios. (a) Las clorofilas *a* y *b* y la bacterioclorofila son los principales colectores de energía luminosa. **(b)** La ficoeritrobilina y la ficocianobilina (ficobilinas) son los pigmentos antena en cianobacterias y algas rojas. **(c)** El β-caroteno (un carotenoide) y **(d)** la luteína (una xantofila) son pigmentos accesorios en plantas. Las áreas sombreadas en rosa representan los sistemas conjugados (enlaces sencillos y dobles alternados) que justifican en gran parte la absorción de la luz visible.

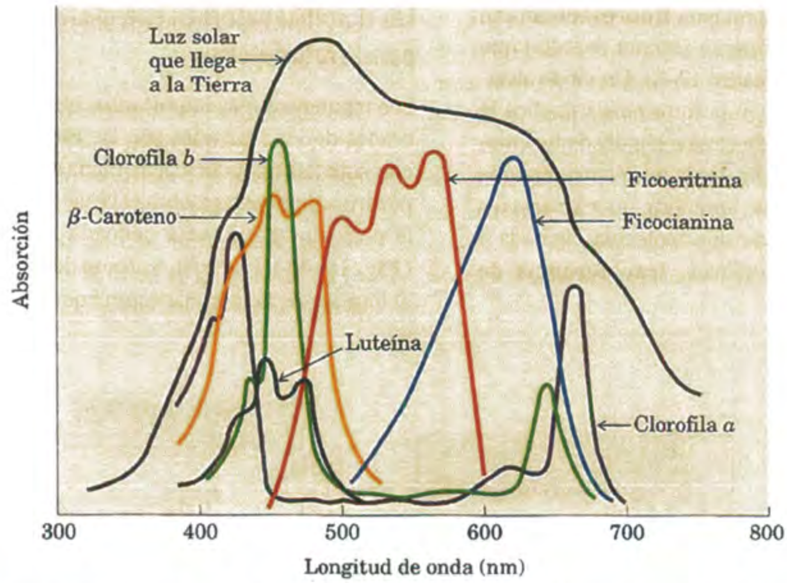


FIGURA 19–48 Absorción de la luz visible por fotopigmentos. Las plantas son verdes porque sus pigmentos absorben luz de las regiones roja y azul del espectro, dejando principalmente que la luz verde se refleje o transmita. Compare los espectros de absorción de los pigmentos con el espectro de la luz solar que alcanza la superficie de la Tierra; la combinación de clorofilas (*a* y *b*) y pigmentos accesorios permite que las plantas capten la mayor parte de la energía disponible de la luz solar.

Las cantidades relativas de clorofilas y pigmentos accesorios son características para una especie dada de planta. La variación en la proporción de estos pigmentos es responsable de la gama de colores de los organismos fotosintéticos, desde el azul verdoso profundo de las agujas de la pícea al color más verdoso de las hojas de arce, al color rojo, marrón o púrpura de algunas especies de algas pluricelulares y de las hojas de algunas plantas decorativas.

las clorofilas tienen una cadena lateral larga de **fitol,** esterificado a un grupo carboxilo sustituyente del anillo IV. Además, las clorofilas tienen un quinto anillo de cinco átomos que no está presente en el hemo.

El sistema de cinco anillos heterocíclicos que rodea el Mg^{2+} tiene una estructura poliénica extendida con enlaces sencillos y dobles alternantes. Este tipo de polienos muestra una absorción fuerte característica en la región visible del espectro **(Fig. 19–48)**; las clorofilas tiene coeficientes de absorción molar anormalmente elevados (véase el Recuadro 3–1), por lo que están especialmente capacitadas para absorber la luz visible durante la fotosíntesis.

Los cloroplastos siempre contienen tanto clorofila *a* como clorofila *b* (Fig. 19–47a). Aunque las dos son verdes, sus espectros de absorción son suficientemente diferentes (Fig. 19–48) para que los dos pigmentos complementen sus gamas de absorción de la luz en la región visible. La mayoría de plantas contienen aproximadamente el doble de clorofila *a* que de clorofila *b*. Los pigmentos de las algas y de las bacterias fotosintéticas contienen clorofilas que sólo difieren ligeramente de los pigmentos de las plantas.

Las clorofilas están invariablemente asociadas a proteínas de unión específicas, formando los **complejos de captación de la luz** (**LHC,** de light–harvesting complexes) en los que las moléculas de clorofila están en posiciones fijas en relación una con otra, con otros complejos proteicos y con la membrana. A partir de cristalografía de rayos X se conoce la estructura detallada de un complejo de captura de luz (LCHII; **Fig. 19–49**). Contiene siete moléculas de clorofila *a*, cinco de clorofila *b* y dos del pigmento accesorio luteína (véase más adelante).

Las cianobacterias y las algas rojas utilizan **ficobilinas** tales como la ficoeritrobilina y la ficocianobilina (Fig. 19–47b) como pigmentos capturadores de luz. Estos tetrapirroles de cadena abierta tienen el sistema poliénico extendido que se encuentra en las clorofilas, pero no su estructura cíclica ni su Mg^{2+} central. Las ficobilinas están unidas covalentemente a proteínas de unión específicas, formando las **ficobiliproteínas,** que se

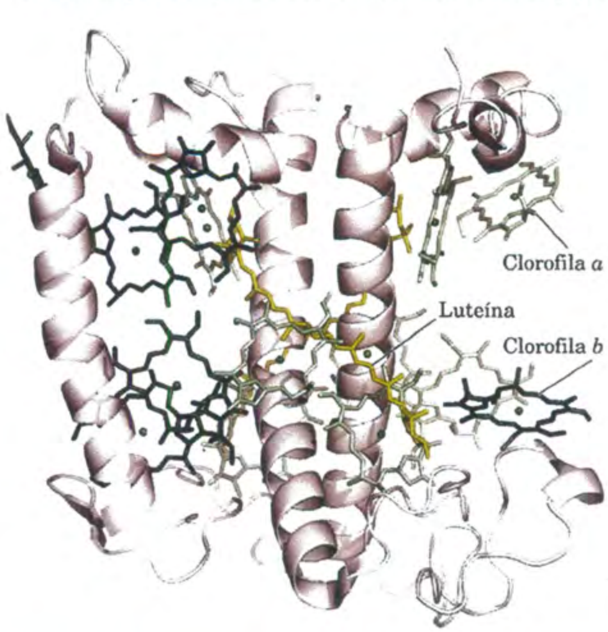


FIGURA 19–49 Un complejo de captura de luz, LHCII. (PDB ID 2BHW) La unidad funcional es un trímero LHC, con 36 moléculas de clorofila y seis moléculas de luteína. Se muestra aquí un monómero visto en el plano de la membrana con sus tres segmentos α-helicoidales transmembrana, siete moléculas de clorofila *a* (verde claro), cinco moléculas de clorofila *b* (verde oscuro) y dos moléculas del pigmento accesorio luteína (amarillo), que forman una abrazadera transversal interna.

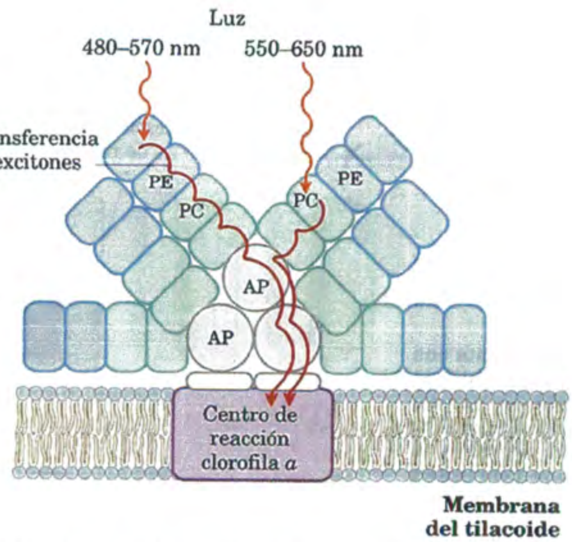


FIGURA 19–50 Un ficobilisoma. En estos conjuntos altamente estructurados presentes en cianobacterias y algas rojas, los pigmentos de ficobilina se unen a proteínas específicas que forman complejos llamados ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) y aloficocianina (AP). La energía de los fotones absorbidos por PE o PC es transmitida por AP (una proteína de unión a ficocianobilina) a la clorofila *a* del centro de reacción mediante transferencia de excitones (véase texto).

asocian en complejos altamente ordenados llamados ficobilisomas **(Fig. 19–50)** que representan las principales estructuras de captación de luz en estos microorganismos.

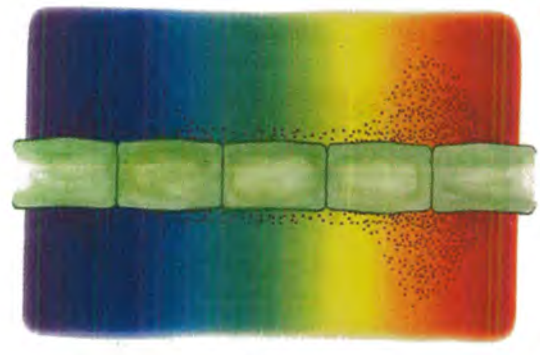
Los pigmentos accesorios aumentan la gama de absorción de la luz

Además de clorofilas, las membranas tilacoides contienen pigmentos secundarios que también absorben la luz, o **pigmentos accesorios,** llamados carotenoides. Los **carotenoides** pueden ser amarillos, rojos o púrpura. Los más importantes son el **β-caroteno,** un compuesto isoprenoide rojo anaranjado, y el carotenoide amarillo **luteína** (Fig. 19–47c, d). Los pigmentos carotenoides absorben luz de longitud de onda diferente de la absorbida por las clorofilas (Fig. 19–48), por lo que son receptores luminosos suplementarios.

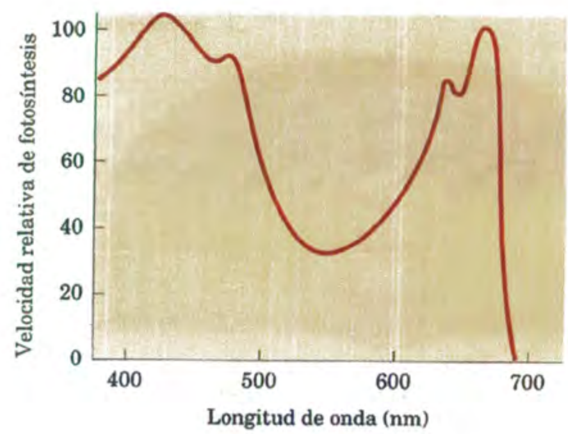
La determinación experimental de la efectividad de la luz de diferentes colores para promover la fotosíntesis da lugar a un **espectro de acción (Fig. 19–51)** que a menudo es útil para identificar el pigmento responsable principal de un efecto biológico de la luz. Al capturar luz en una región del espectro no utilizada por otros organismos, un organismo fotosintético puede reclamar un nicho ecológico propio. Por ejemplo, las ficobilinas, presentes en algas rojas y en cianobacterias, absorben luz en la región de 520 a 630 nm (Fig. 19–48), permitiendo a estos organismos vivir en nichos en los que la luz de longitudes de onda mayores o menores ha sido filtrada por los pigmentos de otros organismos que viven en el agua por encima de ellos o por la propia agua.

La clorofila canaliza la energía absorbida a centros de reacción mediante transferencia de excitones

Los pigmentos de las membranas tilacoides que absorben luz están dispuestos en conjuntos funcionales denominados **fotosistemas.** En los cloroplastos de espinaca, por ejemplo, cada fotosistema contiene unas 200 moléculas de clorofila y unas 50 moléculas de carotenoides. Todas las moléculas de pigmento de un fotosistema pueden absorber fotones, pero sólo unas pocas moléculas de clorofila asociadas al **centro de reacción fotoquímico** están especializadas en transducir la energía luminosa en energía química. Las otras moléculas de pigmento de un fotosistema se denominan **moléculas captadoras de luz** o **moléculas antena.** Absorben energía lumi-



(a)



(b)

FIGURA 19–51 Dos formas de determinar el espectro de acción de la fotosíntesis. **(a)** Resultados de un experimento clásico realizado por T.W. Englemann en 1882 para determinar qué longitud de onda de la luz era la más efectiva en promover la fotosíntesis. Englemann colocó un alga fotosintética filamentosa en el portaobjetos de un microscopio y la iluminó con luz de un prisma de modo que las células en una parte del filamento recibían principalmente luz azul, otras amarilla y otras roja. Para determinar qué células tenían una actividad fotosintética más importante, también colocó en el portaobjetos bacterias que se sabe migran hacia regiones con alta concentración de O_2. Después de un período de iluminación la distribución de las bacterias demostró que los niveles de O_2 más elevados (producidos por la fotosíntesis) estaban en las regiones iluminadas con luz violeta y roja.

(b) Un experimento similar utilizando técnicas modernas (un electrodo de oxígeno) para la medición de la producción de O_2. Un espectro de acción (tal como se muestra aquí) describe la velocidad relativa de la fotosíntesis para la iluminación con un número constante de fotones de diferente longitud de onda. Tales espectros de acción son útiles porque sugieren (por comparación con espectros de absorción tales como los de la Fig. 19–48) qué pigmentos pueden canalizar la energía hacia la fotosíntesis.

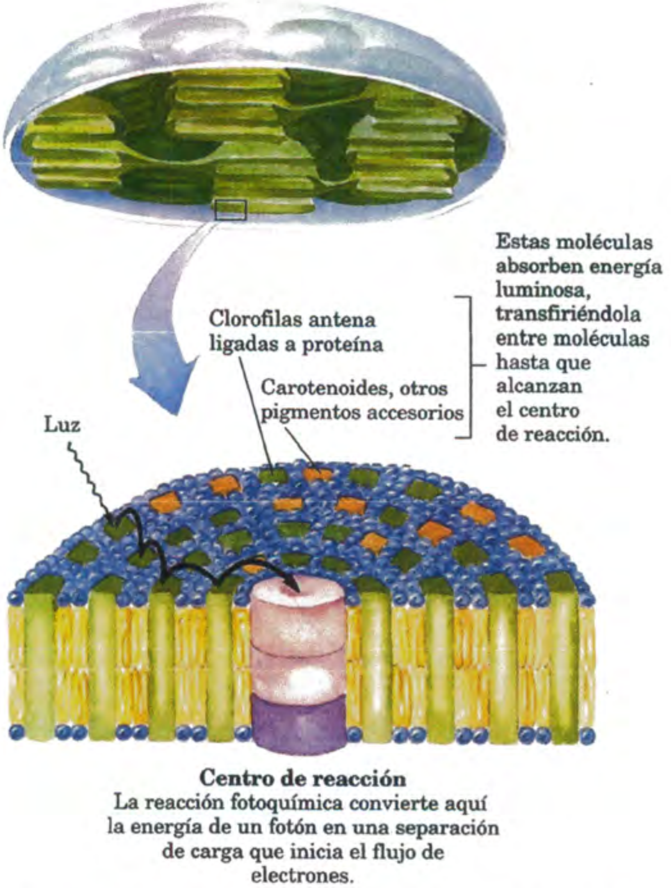


FIGURA 19–52 Organización de los fotosistemas en la membrana del tilacoide. Los fotosistemas están empaquetados de forma apretada en la membrana del tilacoide, con varios centenares de clorofilas antena y pigmentos accesorios rodeando un centro de fotorreacción. La absorción de un fotón por una cualquiera de las clorofilas antena origina la excitación del centro de reacción por transferencia de excitones (flecha negra). El complejo del citocromo b_6f y la ATP sintasa también se encuentran incrustados en la membrana del tilacoide (véase la Fig. 19–60).

nosa y la transmiten rápida y eficientemente hasta el centro de reacción **(Fig. 19–52)**.

Las moléculas de clorofila en los complejos captadores de luz tienen propiedades de absorción de la luz que son sutilmente diferentes a las de la clorofila libre. Cuando se excitan por la luz moléculas de clorofila aisladas in vitro, la energía absorbida se libera rápidamente en forma de fluorescencia y calor, pero cuando se excita la clorofila por la luz visible en hojas intactas **(Fig. 19–53**, paso ①), se observa muy poca fluorescencia. Lo que ocurre en su lugar es una transferencia directa de energía desde la clorofila antena excitada a una molécula de clorofila vecina, que queda excitada al tiempo que la primera molécula

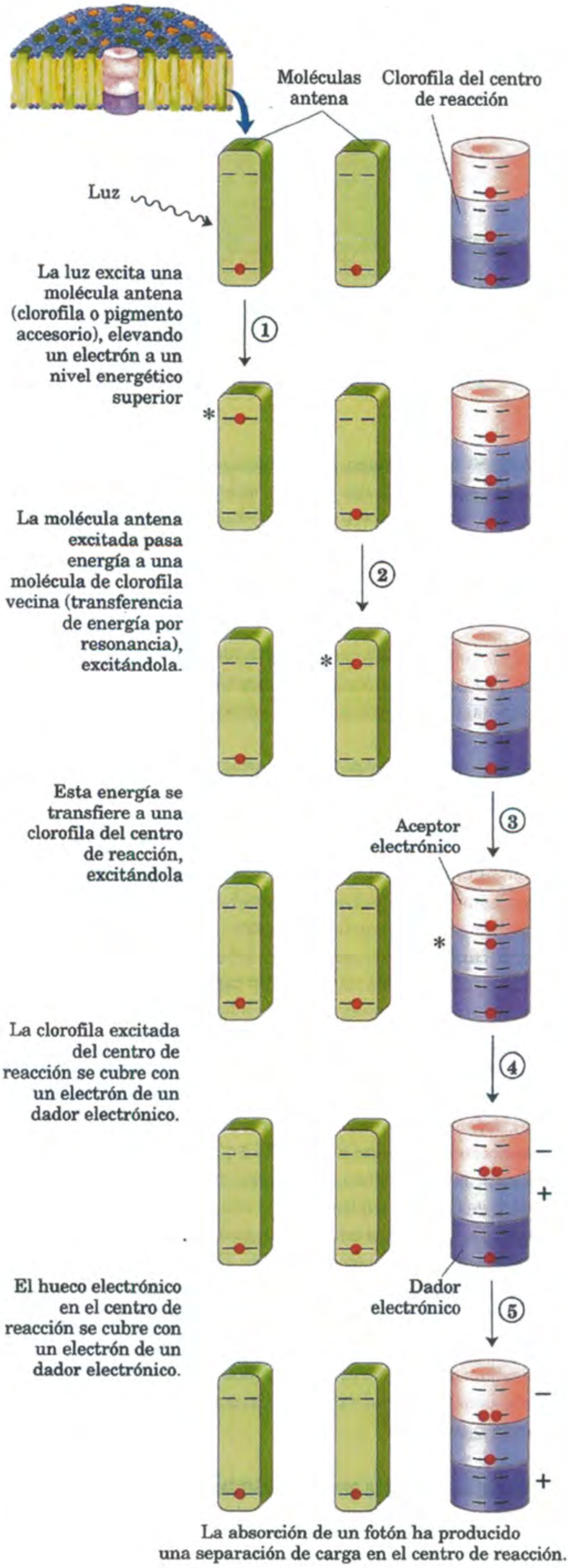


FIGURA 19–53 Transferencia de excitones. Este esquema generalizado muestra la conversión de energía de un fotón absorbido en separación de cargas en el centro de reacción. Los pasos se describen detalladamente en el texto. Observe que el paso ① puede repetirse entre moléculas antena sucesivas hasta que el excitón alcanza una clorofila del centro de reacción. El asterisco (*) representa el estado excitado de una molécula antena.

vuelve a su estado basal (paso ②). Esta transferencia de energía, transferencia de excitones, se repite a un tercer, cuarto o posterior vecino hasta que se excita una de un par especial de moléculas de clorofila *a* en el centro de reacción fotoquímico (paso ③). En esta molécula de clorofila excitada se promueve el paso de un electrón a un orbital de energía superior. Este electrón pasa a continuación a un aceptor electrónico vecino que forma parte de la cadena de transferencia electrónica, dejando la clorofila del centro de reacción con un electrón menos (un "hueco electrónico" indicado por + en la Fig. 19–53) (paso ④). El aceptor electrónico adquiere una carga negativa en esta transacción. El electrón perdido por la clorofila del centro de reacción es reemplazado por un electrón de una molécula dadora de electrones vecina (paso ⑤), que queda de este modo cargada positivamente. De esta forma, *la excitación por la luz produce una separación de carga eléctrica e inicia una cadena de oxidación-reducción.*

RESUMEN 19.7 Absorción de la luz

- En la fotofosforilación que tiene lugar en los cloroplastos de las plantas verdes y en las cianobacterias interviene un flujo electrónico a través de una serie de transportadores ligados a la membrana.
- En las reacciones luminosas de las plantas, la absorción de un fotón excita moléculas de clorofila y otros pigmentos (accesorios) que canalizan la energía hacia centros de reacción situados en las membranas tilacoides. En los centros de reacción la fotoexcitación produce una separación de cargas que produce una especie que es un buen dador electrónico (agente reductor) y otro que es un buen aceptor electrónico.

19.8 El acontecimiento fotoquímico central: el flujo electrónico impulsado por la luz

La transferencia de electrones impulsada por la luz en los cloroplastos de las plantas durante la fotosíntesis se consigue gracias a sistemas multienzimáticos presentes en las membranas de los tilacoides. La visión actual de los mecanismos fotosintéticos es una composición a partir de los estudios realizados en cloroplastos de plantas y de una variedad de bacterias y algas. La determinación (por cristalografía de rayos X) de las estructuras moleculares de complejos fotosintéticos bacterianos nos ofrece una comprensión mejorada de los procesos moleculares que se dan durante la fotosíntesis.

Las bacterias tienen uno de entre dos tipos de centros de reacción fotoquímicos individuales

Un aspecto principal derivado de los estudios con bacterias fotosintéticas se reveló en 1952 cuando Louis Duysens descubrió que la iluminación de membranas fotosintéticas de la bacteria púrpura *Rhodospirillum rubrum* con un pulso de luz de una longitud de onda específica (870 nm) originaba una disminución temporal en la absorción de la luz a aquella longitud de onda; un pigmento se había "decolorado" por la luz de 870 nm. Estudios posteriores realizados por Bessel Kok y Horst Witt mostraron decoloraciones similares de los pigmentos de los cloroplastos de plantas por la luz de 680 y 700 nm. Además, la adición del aceptor de electrones ferricianuro (no biológico) $[Fe(CN)_6]^{3-}$ originó la decoloración a esas longitudes de onda *sin iluminación*. Por lo tanto, la decoloración de los pigmentos se debía a la pérdida de un electrón de un centro de reacción fotoquímico. Estos pigmentos se designaron en función de la longitud de onda de máxima decoloración: P870, P680 y P700.

Las bacterias fotosintéticas poseen una maquinaria de fototransducción relativamente sencilla, con uno de entre dos tipos generales de centros de reacción. Uno de los tipos (encontrado en bacterias púrpura) pasa los electrones a través de la **feofitina** (clorofila que no contiene el ión Mg^{2+} central) a una quinona. El otro (en bacterias verdes del azufre) pasa los electrones a través de una quinona hasta un centro ferro-sulfurado. Las cianobacterias y las plantas tienen dos fotosistemas (PSI, PSII), uno de cada tipo, que actúan en tándem. Estudios bioquímicos y biofísicos han revelado muchos detalles moleculares de los centros de reacción de bacterias que sirven, por tanto, como prototipos de los sistemas de fototransducción más complejos de las plantas superiores.

El centro de reacción feofitina-quinona (centro de reacción Tipo II) La maquinaria fotosintética de las bacterias púrpura consta de tres módulos básicos **(Fig. 19–54a)**: un único centro de reacción (P870), un complejo citocromo bc_1 de transferencia de electrones similar al Complejo III de la cadena de transferencia electrónica mitocondrial y una ATP sintasa, también similar a la encontrada en mitocondrias. La iluminación impulsa los electrones a través de la feofitina y una quinona al complejo del citocromo bc_1; después de pasar por el complejo, los electrones vuelven al centro de reacción a través del citocromo c_2, restableciendo su estado preiluminado. Este flujo cíclico de electrones impulsado por la luz proporciona la energía necesaria para el bombeo de protones por el complejo del citocromo bc_1. Impulsado por el gradiente protónico resultante, la ATP sintasa produce ATP, exactamente igual que en la mitocondria.

Las estructuras tridimensionales de los centros de reacción de las bacterias púrpura (*Rhodopseudomonas viridis* y *Rhodobacter sphaeroides*), deducidas a partir de cristalografía de rayos X, dio respuestas sobre cómo se da la fototransducción en un centro de reacción feofitina-quinona. El centro de reacción de *R. viridis* **(Fig. 19–55a)** es un complejo proteico grande que contiene cuatro subunidades polipeptídicas y 13 cofactores: dos pares de clorofilas bacterianas, un par de feofitinas, dos quinonas, un hierro no hemo y cuatro hemos en el citocromo asociado del tipo *c*.

La secuencia de transferencias de electrones extremadamente rápida mostrada en la Figura 19–55b se ha deducido a partir de estudios físicos de los centros feofitina-quinona bacterianos, utilizando breves destellos de luz para provocar la fototransducción y una variedad de técnicas espectroscópicas para seguir el flujo de electrones a través de varios transportadores. Un par de bacterioclorofilas, el "par especial", designado $(Chl)_2$, es el sitio donde se da la fotoquímica inicial del centro de reacción bacteriano. La energía de un fotón absorbido por una de las muchas moléculas de clorofila antena que rodean el centro

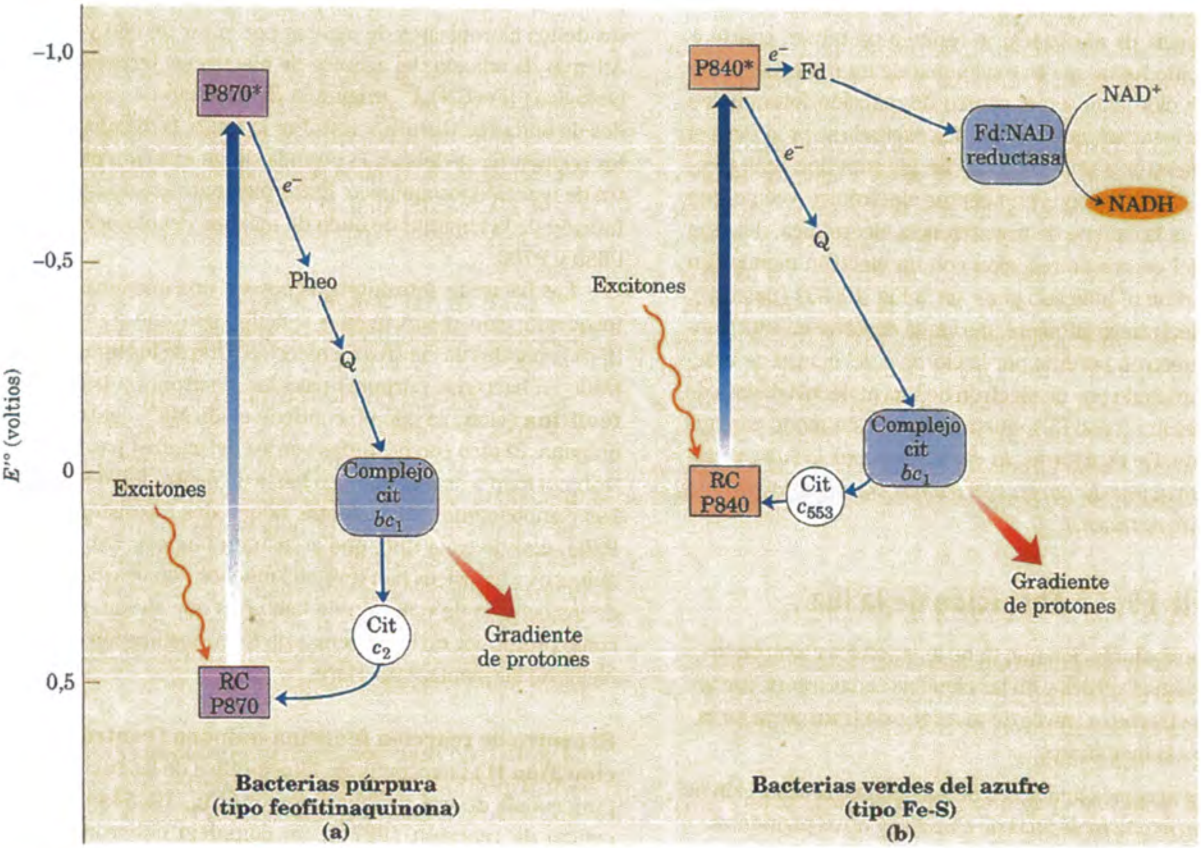


FIGURA 19–54 Módulos funcionales de la maquinaria fotosintética en bacterias púrpura y bacterias verdes del azufre. (a) En las bacterias púrpura, la energía luminosa impulsa los electrones desde el centro de reacción P870 a través de la feofitina (Pheo), una quinona (Q) y el complejo del citocromo bc_1, y a continuación a través del citocromo c_2 para volver al centro de reacción. El flujo de electrones a través del complejo del citocromo bc_1 genera el bombeo de protones, creando un potencial electroquímico que impulsa la síntesis de ATP. **(b)** Las bacterias verdes del azufre tienen dos rutas para los electrones impulsados por la excitación de P840: una ruta cíclica pasa a través de una quinona hacia el complejo del citocromo bc_1 y de vuelta al centro de reacción vía citocromo *c*, y una ruta no cíclica que pasa desde el centro de reacción a través de la proteína ferro-sulfurada ferredoxina (Fd), y a continuación al NAD^+ en una reacción catalizada por la ferredoxina:NAD reductasa.

de reacción llega a $(Chl)_2$ por transferencia de excitones. Cuando estas dos moléculas de clorofila, tan cercanas que sus orbitales de enlace se solapan, absorben un excitón, el potencial redox de $(Chl)_2$ se desplaza en una cantidad equivalente a la energía del fotón, convirtiendo el par especial en un dador electrónico muy fuerte. $(Chl)_2$ cede un electrón, el cual pasa a través de un monómero de clorofila vecino hacia la feofitina (Pheo). Este hecho produce dos radicales, uno cargado positivamente (el par especial de clorofilas) y otro cargado negativamente (la feofitina):

$$(Chl)_2 + 1 \text{ excitón} \longrightarrow (Chl)_2^* \qquad \text{(excitación)}$$

$$(Chl)_2^* + Pheo \longrightarrow {}^{\cdot}(Chl)_2^+ + {}^{\cdot}Pheo^- \qquad \text{(separación de cargas)}$$

Ahora el radical de feofitina cede su electrón a una molécula de quinona unida fuertemente (Q_A), convirtiéndola en un radical semiquinona, que inmediatamente dona su electrón extra a una segunda quinona débilmente ligada (Q_B). Dos transferencias electrónicas de este tipo convierten Q_B en su forma totalmente reducida, Q_BH_2, que puede difundir de forma libre por la bicapa de la membrana, alejándose del centro de reacción:

$$2\,{}^{\cdot}Pheo^- + 2H^+ + Q_B \longrightarrow 2\,Pheo + Q_BH_2 \qquad \text{(reducción de la quinona)}$$

La hidroquinona (Q_BH_2), que lleva en sus enlaces químicos parte de la energía de los fotones que inicialmente excitaron P870, pasa a formar parte de la reserva de quinona reducida (QH_2) disuelta en la membrana y se desplaza por la fase lipídica de la bicapa hacia el complejo del citocromo bc_1.

Al igual que el homólogo Complejo III de las mitocondrias, el complejo del citocromo bc_1 de las bacterias púrpura transporta electrones desde un dador quinol (QH_2) a un aceptor electrónico, utilizando la energía de la transferencia de electrones para bombear protones a través de la membrana, produciendo una fuerza protón-motriz. Se cree que la vía del flujo de electrones a través de este complejo es muy parecida a la que pasa a través del Complejo III mitocondrial, implicando un ciclo Q (Fig. 19–12) en el que los protones se consumen en un lado de la membrana y se liberan en el otro. El aceptor electrónico final en las bacterias púrpura es la forma desprovista de electrones de P870, ${}^{\cdot}(Chl)_2^+$ (Fig. 19–54a). Los electrones se desplazan desde el complejo del citocromo bc_1 al P870 vía un citocromo soluble del tipo *c*, el citocromo c_2. El proceso de transferencia de electrones completa el ciclo, devolviendo el centro de reacción a su estado no decolorado, dejándolo listo para absorber otro excitón de la clorofila antena.

Una característica notable de este sistema es que toda la química tiene lugar en *estado sólido*, con las especies reactivas

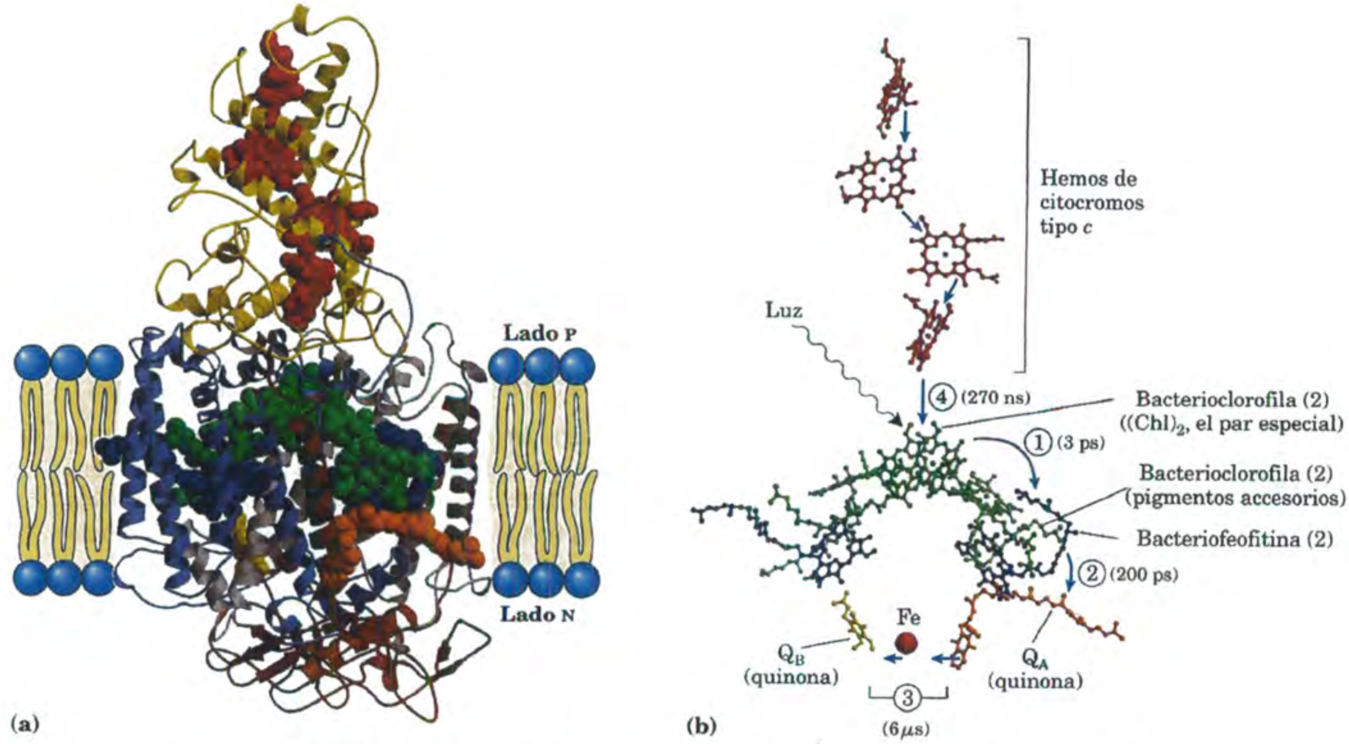


FIGURA 19–55 Centro de fotorreacción de la bacteria púrpura *Rhodopseudomonas viridis.* (PDB ID 1PRC) **(a)** El sistema tiene cuatro componentes: tres subunidades, H, M y L (marrón, azul y gris, respectivamente), con un total de 11 segmentos helicoidales transmembrana, y una cuarta proteína, el citocromo c (amarillo), asociada con el complejo en la superficie de la membrana. Las subunidades L y M son proteínas transmembrana emparejadas que juntas forman una estructura cilíndrica con una simetría aproximadamente bilateral a lo largo de su eje longitudinal. Los grupos prostéticos que participan en el acontecimiento fotoquímico se muestran como modelos espaciales (y en **(b)** como estructuras en forma de bolas y varillas). Hay dos pares de moléculas de bacterioclorofila (verde) unidas a las cadenas L y M; uno de los pares (el "par especial", $(Chl)_2$) es el sitio donde se dan los primeros cambios fotoquímicos después de la absorción de la luz. También se incorporan al sistema un par de moléculas de feofitina (Pheo a) (azul); dos quinonas, menaquinona (Q_A) y ubiquinona (Q_B) (naranja y amarillo), también ordenadas con simetría bilateral, y un único Fe no hemo (rojo) localizado aproximadamente en el eje de simetría entre las quinonas. Los cuatro grupos hemo (rojo) asociados con el citocromo del tipo c del centro de reacción se muestran en la parte superior de la figura. El centro de reacción de otra bacteria púrpura, *Rhodobacter sphaeroides*, es muy similar, a excepción de que el citocromo c no forma parte del complejo cristalino.

(b) Secuencia de sucesos que siguen a la excitación del par especial de bacterioclorofilas (todos los componentes tienen el mismo color que en **(a)**), con la escala de tiempo de las transferencias electrónicas en paréntesis. ① El par especial excitado pasa un electrón a la feofitina, ② a partir de la cual el electrón se desplaza rápidamente a la menaquinona unida fuertemente, Q_A. ③ Esta quinona transfiere electrones mucho más lentamente a la ubiquinona difundible, Q_B, a través del Fe no hemo. Mientras tanto, ④ el "hueco electrónico" en el par especial se rellena con un electrón de un hemo del citocromo c.

mantenidas muy próximas unas de otras con la orientación adecuada para la reacción. El resultado es una serie de reacciones muy rápidas y eficientes.

El centro de reacción Fe–S (centro de reacción Tipo I)
En la fotosíntesis en bacterias verdes del azufre intervienen las mismas tres moléculas que en bacterias púrpura, aunque el proceso se diferencia en varios aspectos y comporta reacciones enzimáticas adicionales (Fig. 19-54b). La excitación hace que un electrón se desplace desde el centro de reacción hacia el complejo del citocromo bc_1 vía un transportador quinona. La transferencia electrónica a través de este complejo impulsa el transporte de protones y crea la fuerza protón-motriz necesaria para la síntesis de ATP, al igual que en las bacterias púrpura y en las mitocondrias. Sin embargo, a diferencia del flujo cíclico de electrones en las bacterias púrpura, algunos electrones fluyen desde el centro de reacción hacia una proteína ferro-sulfurada, la **ferredoxina,** que entonces pasa los electrones vía la ferredoxina:NAD reductasa al NAD^+, produciendo NADH. Los electrones tomados del centro de reacción para reducir el NAD^+ se reemplazan gracias a la oxidación de H_2S a S elemental y, a continuación, a SO_4^{2-}, en la reacción característica de las bacterias verdes del azufre. Esta oxidación de H_2S por las bacterias es químicamente análoga a la oxidación del H_2O por las plantas oxigénicas.

Factores cinéticos y termodinámicos evitan la disipación de energía por conversión interna

La compleja construcción de los centros de reacción es el resultado de la selección evolutiva hacia la eficiencia en el proceso fotosintético. El estado excitado $(Chl)_2^*$ en principio podría decaer a su estado basal por conversión interna, un proceso muy rápido (10 picosegundos; 1 ps = 10^{-12} s) en el cual la energía del fotón absorbido se convierte en calor (movimiento molecular). Los centros de reacción están construidos para evitar la ineficiencia que resultaría de la conversión interna. Las proteínas del centro de reacción mantienen las bacterioclorofilas, bacteriofeofitinas y quinonas en una orientación fija entre ellas, lo que permite que las reacciones fotoquímicas

tengan lugar en un estado sólido virtual. Ello explica la gran eficiencia y rapidez de las reacciones; nada ha de colisionar ni depende de una difusión al azar. La transferencia de excitones desde la clorofila antena hasta el par especial del centro de reacción se consigue en menos de 100 ps con una eficiencia >90%. A los 3 ps de la excitación de P870, la feofitina ha recibido un electrón y se convierte en un radical cargado negativamente; menos de 200 ps más tarde, el electrón ha llegado a la quinona Q_B (Fig. 19–55b). Las reacciones de transferencia electrónica no sólo son rápidas, sino que son termodinámicamente favorables; el par especial excitado $(Chl)_2^*$ es un dador de electrones muy bueno ($E'^\circ = -1$ V), y cada transferencia electrónica sucesiva es hacia un aceptor de E'° sustancialmente menos negativo. Por tanto, la variación en energía libre estándar del proceso es negativa y grande; recuerde del Capítulo 13 que $\Delta G'^\circ = -n\mathcal{F}\Delta E'^\circ$, donde $\Delta E'^\circ$ es la diferencia entre los potenciales de reducción estándar de las dos medias reacciones:

$$(1)\ (Chl)_2^* \longrightarrow {}^{\bullet}(Chl)_2^+ + e^- \qquad E'^\circ = -1{,}0\ \text{V}$$

$$(2)\ Q + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow QH_2 \qquad E'^\circ = -0{,}045\ \text{V}$$

Así

$$\Delta E'^\circ = -0{,}045\ \text{V} - (-1{,}0\ \text{V}) \approx 0{,}95\ \text{V}$$

y

$$\Delta G'^\circ = -2(96{,}5\ \text{kJ/V} \cdot \text{mol})\ (0{,}95\ \text{V}) = -180\text{kJ/mol}$$

La combinación de la cinética rápida con la termodinámica favorable hace que el proceso sea virtualmente irreversible y muy eficiente. El rendimiento energético global (porcentaje de la energía fotónica conservada en QH_2) es >30%; el resto de la energía se disipa en forma de calor y entropía.

Dos centros de reacción actúan en tándem en las plantas

La maquinaria fotosintética de las cianobacterias modernas, algas y plantas vasculares es más compleja que los sistemas bacterianos de un único centro, y parece que han evolucionado a través de la combinación de dos fotocentros bacterianos más sencillos. Las membranas tilacoides de los cloroplastos tienen dos clases diferentes de fotosistemas, cada uno de ellos con su propio tipo de centro de reacción fotoquímico y un conjunto de moléculas antena. Los dos sistemas tienen

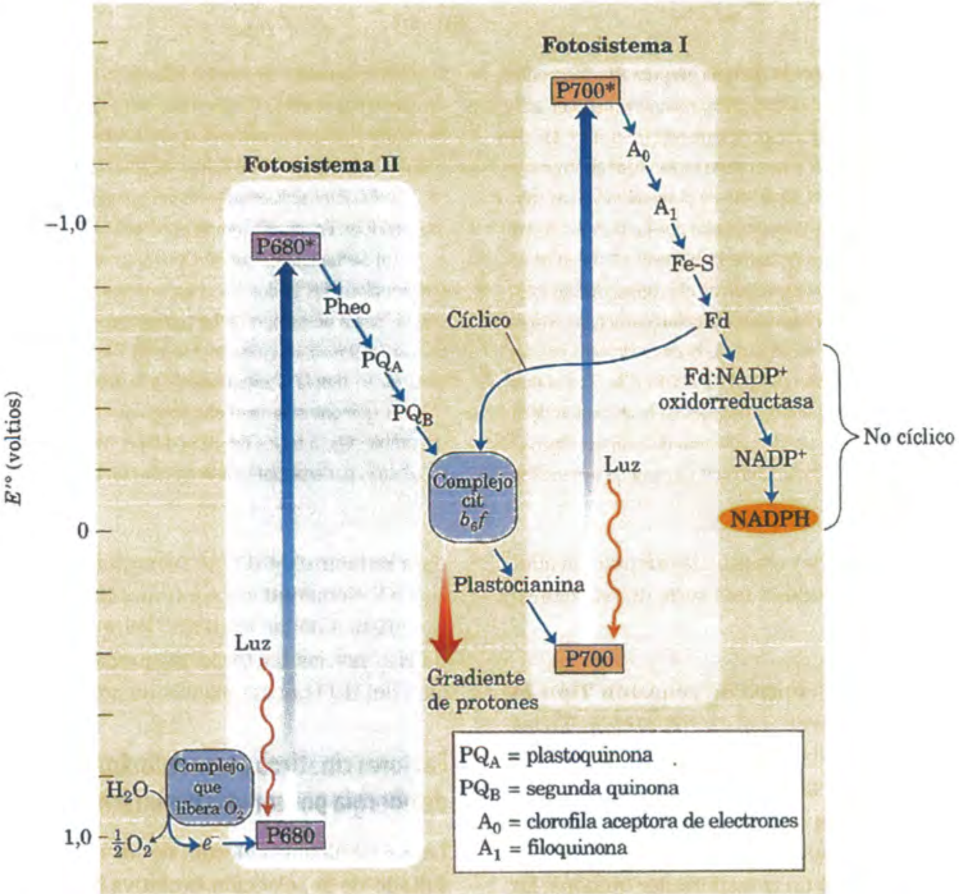


FIGURA 19–56 Integración de los fotosistemas I y II en cloroplastos. Este "esquema en Z" muestra la ruta de transferencia de electrones desde el H_2O (parte inferior izquierda) al $NADP^+$ (derecha) en la fotosíntesis no cíclica. La posición de cada transportador electrónico sobre la escala vertical es un reflejo de su potencial de reducción estándar. Para elevar la energía de los electrones que proceden del H_2O al nivel de energía requerido para reducir el $NADP^+$ a NADPH, cada electrón ha de ser "elevado" dos veces (flechas gruesas) por fotones absorbidos en PSII y PSI. Se requiere un fotón por cada electrón elevado en cada fotosistema. Después de la excitación, los electrones de alta energía fluyen "cuesta abajo" a través de la cadena de transportadores mostrada. Durante la reacción de escisión del agua y durante la transferencia de electrones a través del complejo del citocromo b_6f, se transportan protones a través de la membrana del tilacoide produciendo el gradiente de protones que es crucial para la formación de ATP. Una ruta alternativa de electrones es la transferencia cíclica de electrones en la que los electrones pasan desde la ferredoxina de nuevo al complejo del citocromo b_6f, en lugar de reducir el $NADP^+$ a NADPH. La ruta cíclica produce más ATP y menos NADPH que la no cíclica.

funciones distintas y complementarias (**Fig. 19–56**). El **fotosistema II (PSII)** es un sistema tipo feofitina-quinona (como el fotosistema único de las bacterias púrpura) que contiene cantidades aproximadamente iguales de clorofilas *a* y *b*. La excitación de su centro de reacción P680 impulsa electrones a través del complejo del citocromo b_6f con el movimiento concomitante de protones a través de la membrana del tilacoide. El **fotosistema I (PSI)** está estructural y funcionalmente relacionado con el centro de reacción tipo I de las bacterias verdes del azufre. Tiene un centro de reacción designado P700 y una elevada proporción de clorofila *a* respecto a clorofila *b*. El P700 excitado pasa electrones a la proteína Fe-S ferredoxina y a continuación al $NADP^-$, produciendo NADPH. Las membranas de los tilacoides de un solo cloroplasto de espinaca tienen muchos centenares de cada clase de fotosistema.

Estos dos centros de reacción presentes en plantas actúan en tándem para catalizar el movimiento de electrones impulsado por la luz desde el H_2O hasta el $NADP^+$ (Fig. 19–56). Los electrones son transportados de un fotosistema a otro por la proteína soluble **plastocianina,** un transportador de un único electrón funcionalmente similar al citocromo *c* de la mitocondria. Las cianobacterias y las plantas oxidan H_2O (del mismo modo que las bacterias verdes del azufre oxidan H_2S) para reemplazar los electrones que se trasladan del PSII al PSI y finalmente al $NADP^+$, con lo que se produce O_2 (Fig. 19–56, parte inferior izquierda). Este proceso se conoce como **fotosíntesis oxigénica** para distinguirlo de la fotosíntesis anoxigénica de las bacterias púrpura y verdes del azufre. Todas las células fotosintéticas que desprenden O_2 (las de plantas, algas y cianobacterias) contienen PSI y PSII; los organismos con un único fotosistema no desprenden O_2. El diagrama de la Figura 19–56, a menudo llamado **esquema en Z** debido a su forma global, representa la ruta del flujo electrónico entre los dos fotosistemas así como las relaciones energéticas de las reacciones luminosas. Así, el esquema en Z describe la ruta completa por la que fluyen electrones desde el H_2O al $NADP^+$, según la ecuación:

$$2H_2O + 2NADP^+ + 8\ \text{fotones} \longrightarrow O_2 + 2NADPH + 2H^+$$

Se transfiere un electrón desde el H_2O al $NADP^+$ por cada dos fotones absorbidos (uno por cada fotosistema). Para formar una molécula de O_2, que requiere la transferencia de cuatro electrones desde dos H_2O a dos $NADP^+$, se ha de absorber un total de ocho fotones, cuatro para cada fotosistema.

Los detalles mecanísticos de las reacciones fotoquímicas en PSII y PSI son básicamente similares a las de los dos fotosistemas bacterianos, con algunas adiciones importantes. Dos proteínas muy similares, D1 y D2, forman un dímero casi simétrico en PSII, al cual están unidos todos los cofactores transportadores de electrones (**Fig. 19–57**). La excitación de P680 (en PSII) genera $P680^*$, un excelente dador de electrones que, en picosegundos, transfiere un electrón a la feofitina, dándole una carga negativa ($^{\cdot}Pheo^-$). Con la pérdida de su electrón, el $P680^*$ se transforma en un radical catiónico, $P680^+$. $^{\cdot}Pheo^-$ pasa muy rápidamente su electrón extra a una **plastoquinona, PQ_A** (o Q_A),unida a una proteína que a su vez pasa su electrón a otra quinona, PQ_B (o Q_B), unida más débilmente. Cuando PQ_B ha adquirido dos electrones en dos transferencias de este tipo a partir de PQ_A y dos protones del agua disolvente, se encuentra

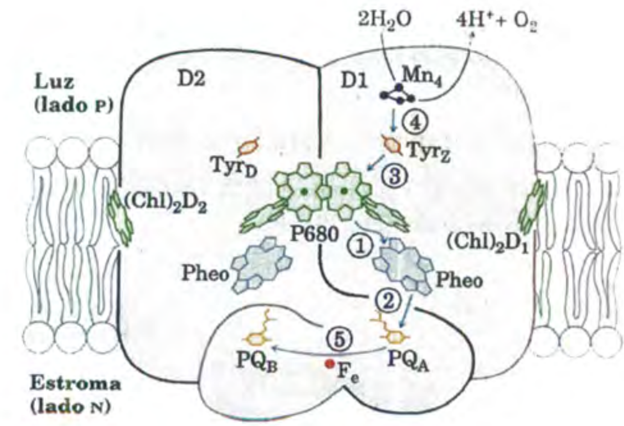


FIGURA 19–57 Fotosistema II de la cianobacteria *Synechococcus elongates*. La forma monomérica del complejo mostrada aquí tiene dos proteínas transmembrana principales, D1 y D2, cada una con su conjunto de cofactores. Aunque las dos subunidades son casi simétricas, el flujo electrónico sólo tiene lugar a través de una de las dos ramas de cofactores, la de la derecha (en D1). Las flechas muestran la ruta del flujo de electrones desde el agrupamiento del ión Mn (Mn_4, púrpura) del enzima de escisión del agua a la quinona PQ_B (naranja). Los procesos fotoquímicos transcurren según la secuencia indicadas por los números de etapa. Observe la gran similitud entre las posiciones de los cofactores aquí y las posiciones en el centro de fotorreacción bacteriano mostrado en la Figura 19–55. La función de los residuos Tyr se discute más adelante en el texto.

en su forma quinol totalmente reducida, PQ_BH_2. La reacción global iniciada por la luz en PSII es, por tanto

$$4\ P680 + 4H^+ + 2\ PQ_B + 4\ \text{fotones} \longrightarrow 4\ P680^+ + 2\ PQ_BH_2 \quad (19\text{–}12)$$

Finalmente, los electrones de PQ_BH_2 pasan a través del complejo del citocromo b_6f (Fig. 19–56). El electrón eliminado inicialmente de P680 es reemplazado por un electrón obtenido de la oxidación del agua, tal como se describe más adelante. El sitio de unión de la plastoquinona es el punto de acción de muchos herbicidas comerciales que matan plantas bloqueando la transferencia electrónica a través del complejo b_6f e impiden la producción fotosintética de ATP.

Los acontecimientos fotoquímicos que siguen a la excitación de PSI en el centro de reacción P700 son formalmente parecidos a los de PSII. El centro de reacción excitado $P700^*$ cede un electrón a un aceptor, A_0 (que se cree que es una forma especial de clorofila, funcionalmente homóloga a la feofitina de PSII), generando A_0^- y $P700^+$ (Fig. 19–56, parte derecha); una vez más, la excitación genera la separación de cargas en el centro de reacción fotoquímico. $P700^+$ es un agente oxidante fuerte, que capta rápidamente un electrón de la plastocianina, una proteína soluble transportadora de electrones que contiene Cu. A_0^- es un agente reductor excepcionalmente fuerte que pasa su electrón a través de una cadena de transportadores que llega finalmente al $NADP^+$. En primer lugar, la **filoquinona** (A_1) acepta un electrón y lo cede a una proteína ferro-sulfurada (a través de tres centros Fe-S de PSI). A partir de este punto, el electrón pasa a la **ferredoxina** (Fd), otra proteína ferro-sulfurada asociada débilmente a la membrana del tilacoide. La ferredoxina de espinaca (M_r 10.700) contiene un centro con 2Fe-2S (Fig. 19–5) que experimenta reacciones de oxidación y reducción de un electrón. El cuarto transportador electrónico de la

cadena es la flavoproteína **ferredoxina:NADP$^+$ oxidorreductasa,** que transfiere electrones desde la ferredoxina reducida (Fd_{red}) al NADP$^+$:

$$2Fd_{red} + 2H^+ + NADP^+ \longrightarrow 2Fd_{ox} + NADPH + H^+$$

Este enzima es homólogo a la ferredoxina:NAD reductasa de las bacterias verdes del azufre (Fig. 19–54b).

Las clorofilas antena están íntimamente asociadas a los transportadores electrónicos

Los cofactores transportadores de electrones de PSI de los complejos capturadores de luz forman parte de un complejo supramolecular **(Fig. 19–58a),** cuya estructura ha sido resuelta cristalográficamente. La proteína consta de tres com-

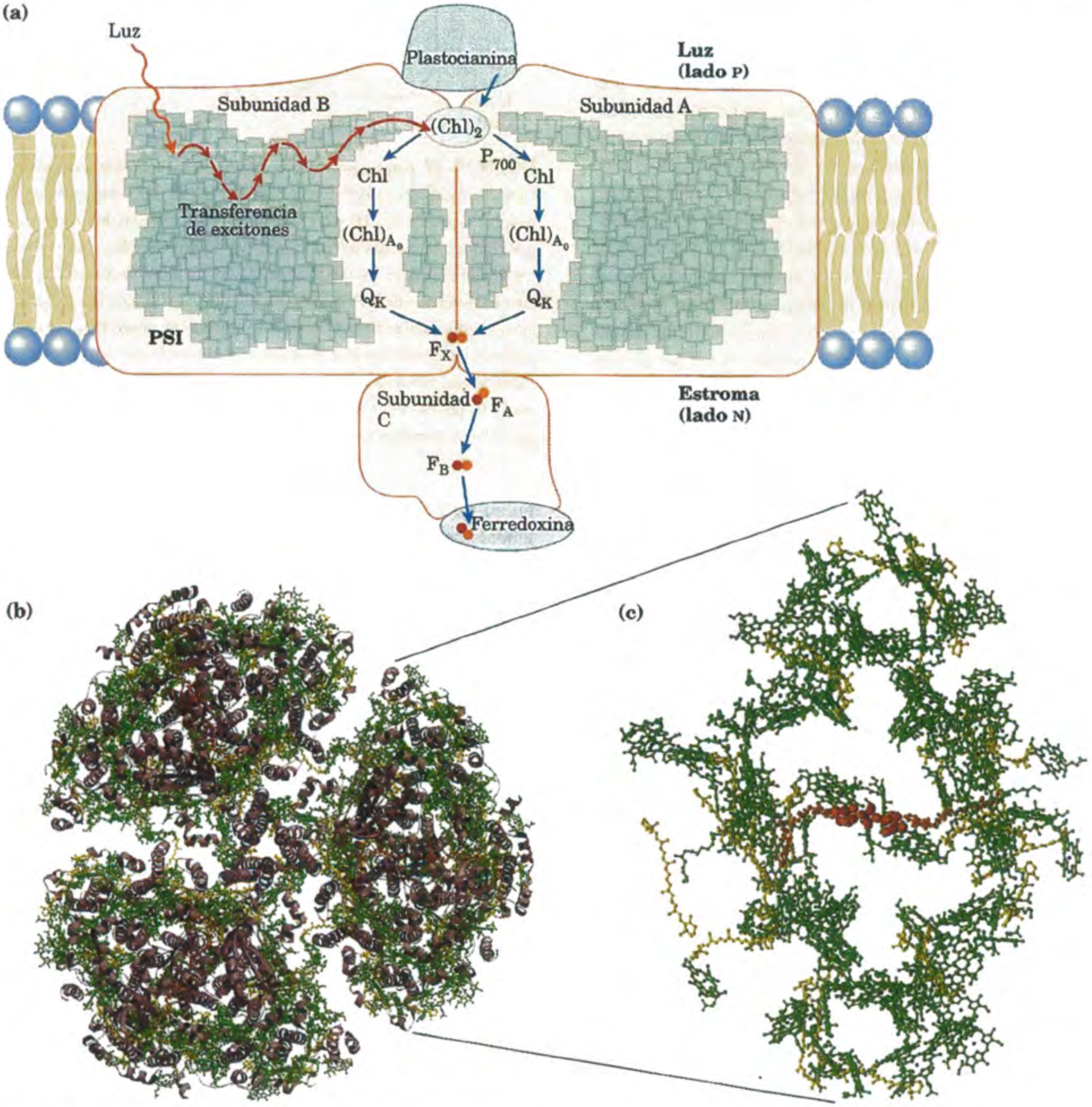


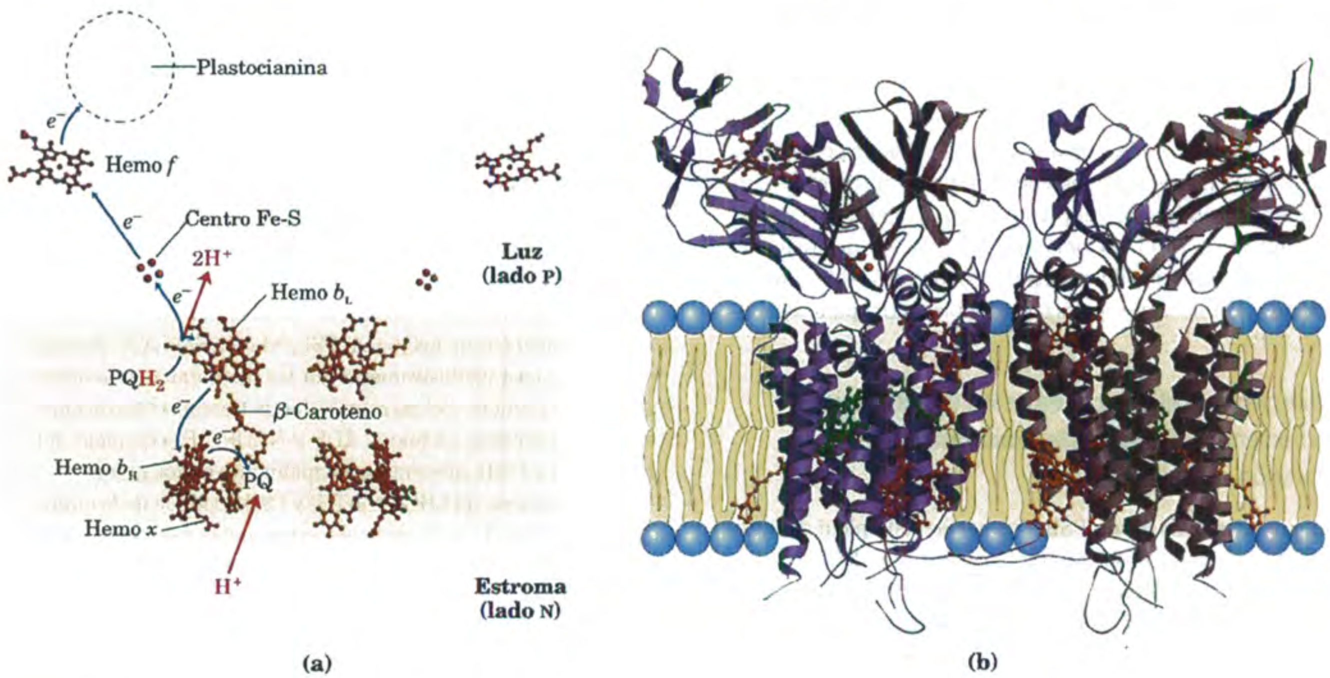
FIGURA 19–58 Complejo supramolecular de PSI y sus clorofilas antena asociadas. **(a)** Dibujo esquemático de las proteínas y cofactores esenciales en una unidad individual de PSI. Un gran número de clorofilas antena rodean el centro de reacción y transportan al mismo (flechas rojas) la energía de los fotones absorbidos. El resultado es la excitación del par de moléculas de clorofila que constituyen P700. La excitación de P700 disminuye muchísimo su potencial de reducción; a continuación P700 pasa un electrón a la filoquinona (Q_K; también denominada A_1) a través de dos clorofilas próximas. La filoquinona reducida se reoxida a medida que pasa dos electrones, de uno en uno (flechas azules), a una proteína Fe-S (F_X) cerca del lado N de la membrana. Desde F_X, los electrones se desplazan a través de otros dos centros Fe-S (F_A y F_B), a la proteína Fe-S ferredoxina del estroma. La ferredoxina cede entonces sus electrones al NADP$^+$ (no mostrado), reduciéndolo a NADPH, una de las formas en las que se capta la energía de los fotones en los cloroplastos.

(b) La estructura trimérica (de PDB ID 1JBO), vista desde la luz del tilacoide perpendicular a la membrana, mostrando todas las subunidades proteicas (gris) y cofactores. **(c)** Un monómero de PSI del que se han omitido todas las proteínas, y que revela las clorofilas antena y las del centro de reacción (verde con iones Mg^{2+} en verde oscuro en el centro), carotenoides (amarillo) y centros Fe-S del centro de reacción (estructuras espaciales roja y naranja). Las proteínas del complejo mantienen los componentes de forma rígida en orientaciones que maximizan las transferencias eficientes de excitones entre las moléculas antena excitadas y el centro de reacción.

plejos idénticos, cada uno de ellos compuesto por 11 proteínas diferentes (Fig. 19–58b). En esta notable estructura las numerosas moléculas de clorofila antena y de carotenoides están ordenadas de forma precisa alrededor del centro de reacción (Fig. 19–58c). Los cofactores transportadores de electrones del centro de reacción están, por tanto, asociados íntimamente a las clorofilas antena. Este ordenamiento permite una transferencia de excitones muy rápida y eficiente desde las clorofilas antena al centro de reacción. A diferencia de la ruta única de electrones en PSII, se cree que el flujo de electrones iniciado por la absorción de un fotón tiene lugar a través de las dos ramas de transportadores en PSI.

El complejo del citocromo b_6f une los fotosistemas II y I

Los electrones almacenados temporalmente en el plastoquinol como resultado de la excitación de P680 del PSII se transportan a P700 de PSI mediante el complejo del citocromo b_6f y la proteína soluble plastocianina (Fig. 19–56, centro). Al igual que el Complejo III de la mitocondria, el complejo del citocromo b_6f **(Fig. 19–59)** contiene un citocromo del tipo *b* con dos grupos hemo (denominados b_H y b_L), una proteína ferro-sulfurada de Rieske, (M_r 20.000) y el citocromo *f* (del latín *frons*, que significa "hoja"). Los electrones fluyen a través del complejo b_6f desde el PQ_BH_2 hasta el citocromo *f*,



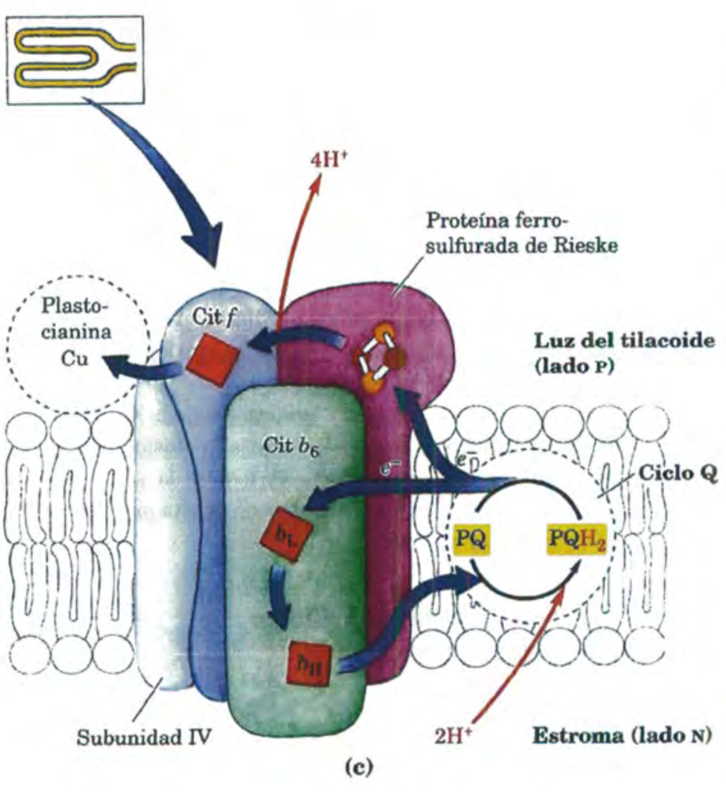


FIGURA 19–59 Flujo de electrones y protones a través del complejo del citocromo b_6f. (a) La estructura cristalina del complejo (PDB ID 1UM3) revela las posiciones de los cofactores que intervienen en transferencias electrónicas. Además de los hemos del citocromo *b* (hemo b_H y b_L; también llamados hemos b_N y b_P, respectivamente, debido a su proximidad a los lados N y P de la bicapa) y del citocromo *f* (hemo *f*), existe un cuarto hemo (hemo *x*) próximo al hemo b_H y un β-caroteno de función desconocida. Dos sitios unen plastoquinona: el sitio PQH_2 cerca del lado P de la bicapa y el sitio PQ cerca del lado N. El centro Fe-S de la proteína de Rieske se encuentra justo fuera de la bicapa en el lado P y el sitio del hemo *f* se encuentra en un dominio proteico que se extiende considerablemente dentro de la luz del tilacoide. **(b)** El complejo es un homodímero dispuesto para crear una caverna que conecta los sitios PQH_2 y PQ (compare con la estructura del Complejo III mitocondrial en la Fig. 19–11). Esta caverna permite el desplazamiento de la plastoquinona entre los sitios de su oxidación y reducción.

(c) El plastoquinol (PQH_2) formado en PSII es oxidado por el complejo del citocromo b_6f en una serie de pasos similares a los del ciclo Q que se da en el complejo del citocromo bc_1 (Complejo III) de la mitocondria (véase la Fig. 19–12). Un electrón de PQH_2 pasa al centro Fe-S de la proteína de Rieske y el otro al hemo b_L del citocromo b_6. El efecto neto es el paso de electrones desde PQH_2 a la proteína soluble plastocianina, que los transporta a PSI.

a continuación a la plastocianina y finalmente a P700, reduciéndolo.

Al igual que el Complejo III de la mitocondria, el citocromo b_6f traspasa los electrones de una quinona reducida, un transportador de dos electrones móvil y liposoluble (Q en mitocondria, PQ_B en cloroplastos), a una proteína hidrosoluble que transporta un electrón (citocromo *c* en la mitocondria, plastocianina en los cloroplastos). Al igual que en las mitocondrias, en la función de este complejo interviene un ciclo Q (Fig. 19–12) en el que los electrones pasan, de uno en uno, desde PQ_BH_2 al citocromo b_6. Como resultado de este ciclo se bombean protones a través de la membrana; en los cloroplastos, la dirección del movimiento protónico es desde el compartimiento del estroma a la luz del tilacoide, desplazándose hasta cuatro protones por cada par de electrones. El resultado es la producción de un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide a medida que pasan los electrones desde PSII a PSI. Dado que el volumen de la luz aplanada del tilacoide es pequeño, la entrada de un número pequeño de protones tiene un efecto relativamente grande sobre el pH de la luz. La diferencia de pH determinada entre el estroma (pH 8) y la luz del tilacoide (pH 5) representa una diferencia de 1.000 veces en la concentración de protones, una importante fuerza motriz para la síntesis de ATP.

El flujo cíclico de electrones entre PSI y el complejo del citocromo b_6f aumenta la producción de ATP en relación a la de NADPH

El flujo electrónico desde PSII a través del complejo del citocromo b_6f y a continuación a través de PSI al $NADP^+$ se denomina a veces **flujo electrónico no cíclico** para diferenciarlo del **flujo electrónico cíclico,** que tiene lugar en proporciones variables que dependen principalmente de las condiciones lumínicas. En el flujo electrónico cíclico sólo interviene PSI y no interviene PSII (Fig. 19–56). Los electrones que pasan desde P700 a la ferredoxina no continúan hasta el $NADP^+$ sino que vuelven a la plastocianina a través del complejo b_6f. (La vía que siguen los electrones encaja con la de las bacterias verdes del azufre mostrada en la Fig. 19–54b.) La plastocianina cede entonces electrones al P700, que los transfiere a la ferredoxina. Así, los electrones se ciclan continuamente a través del complejo del citocromo b_6f y del centro de reacción de PSI, siendo el electrón impulsado alrededor del ciclo por la energía de un fotón. El flujo electrónico cíclico no va acompañado de la formación neta de NADPH ni del desprendimiento de O_2. No obstante, *sí va* acompañado del bombeo de protones por el complejo del citocromo b_6f y de la fosforilación del ADP a ATP, lo que se denomina **fotofosforilación cíclica.** La ecuación global de la reacción para el flujo cíclico de electrones y fotofosforilación es simplemente

$$ADP + P_i \xrightarrow{luz} ATP + H_2O$$

Al regular el reparto de electrones entre la reducción del $NADP^+$ y la fotofosforilación cíclica, una planta ajusta la proporción de ATP a NADPH producidos en las reacciones dependientes de la luz para cubrir las necesidades de estos productos en las reacciones de fijación de carbono y en otros procesos biosintéticos. Tal como veremos en el Capítulo 20, las reacciones de asimilación de carbono necesitan ATP y NADPH en la relación 3:2.

Esta regulación de las rutas de transferencia de electrones constituye una parte de una adaptación a corto plazo a los cambios en el color (longitud de onda) y cantidad (intensidad) de la luz, tal como se describe más adelante.

Transiciones de estado cambian la distribución de LHCII entre los dos fotosistemas

La energía necesaria para excitar PSI (P700) es menor que la requerida para excitar PSII (P680) (a menor longitud de onda luz de mayor energía). En el caso de que PSI y PSII fuesen contiguos, los excitones que se originaran en el sistema antena de PSII migrarían hacia el centro de reacción de PSI, dejando PSII por debajo del estado de excitación de manera crónica e interfiriendo con la operación del sistema de dos centros. Este desequilibrio en el suministro de excitones se evita gracias a la separación de los dos fotosistemas en la membrana del tilacoide **(Fig. 19–60)**. PSII se localiza casi exclusivamente en las pilas de membranas estrechamente empaquetadas de tilacoides de los grana (lamelas del grana); su complejo de captura de luz (LHCII) asociado facilita la fuerte asociación de membranas adyacentes de los grana. PSI y el complejo ATP sintasa se localizan casi exclusivamente en las membranas tilacoides no apiladas (lamelas del estroma), donde tienen acceso al contenido del estroma, incluidos ADP y $NADP^+$. El complejo del citocromo b_6f está presente principalmente en los grana.

La asociación de LHCII con PSI y PSII depende de la intensidad y longitud de onda de la luz, que pueden cambiar a corto plazo, lo que lleva a **transiciones de estado** en el cloroplasto. En el estado 1, hay un residuo Ser crítico en LCHII que no está fosforilado, con lo que LCHII se asocia a PSII. En condiciones de luz intensa o azul, que favorecen la absorción por PSII, este fotosistema reduce la plastoquinona a plastoquinol (PQH_2) más rápidamente de lo que PSI pueda oxidarlo. La acumulación resultante de PQH_2 activa una proteína quinasa que desencadena la transición al estado 2 al fosforilar un residuo Thr de LHCII **(Fig. 19–61)**. La fosforilación debilita la interacción de LHCII con PSII, con lo que una parte de LHCII se disocia y se desplaza hacia las lamelas del estroma; allí captura fotones (excitones) para PSI, acelerando la oxidación de PQH_2 e invirtiendo el desequilibrio del flujo de electrones en PSI y PSII. Con luz menos intensa (en la sombra, con luz más roja), PSI oxida PQH_2 a mayor velocidad de la que es producido por PSII, con lo que el aumento en [PQ] resultante provoca la desfosforilación de LHCII, invirtiendo el efecto de la fosforilación.

La transición de estado en la localización de LHCII está regulada mutuamente con la transición de la fotofosforilación cíclica a la no cíclica, descrita anteriormente; la ruta de los electrones es principalmente no cíclica en el estado 1 y principalmente cíclica en el estado 2.

El agua es escindida por el complejo que desprende oxígeno

El agua es la fuente última de los electrones que pasan al NADPH en la fotosíntesis de plantas (oxigénicas). Una vez cedido un electrón a la feofitina, el $P680^+$ (de PSII) ha de adquirir

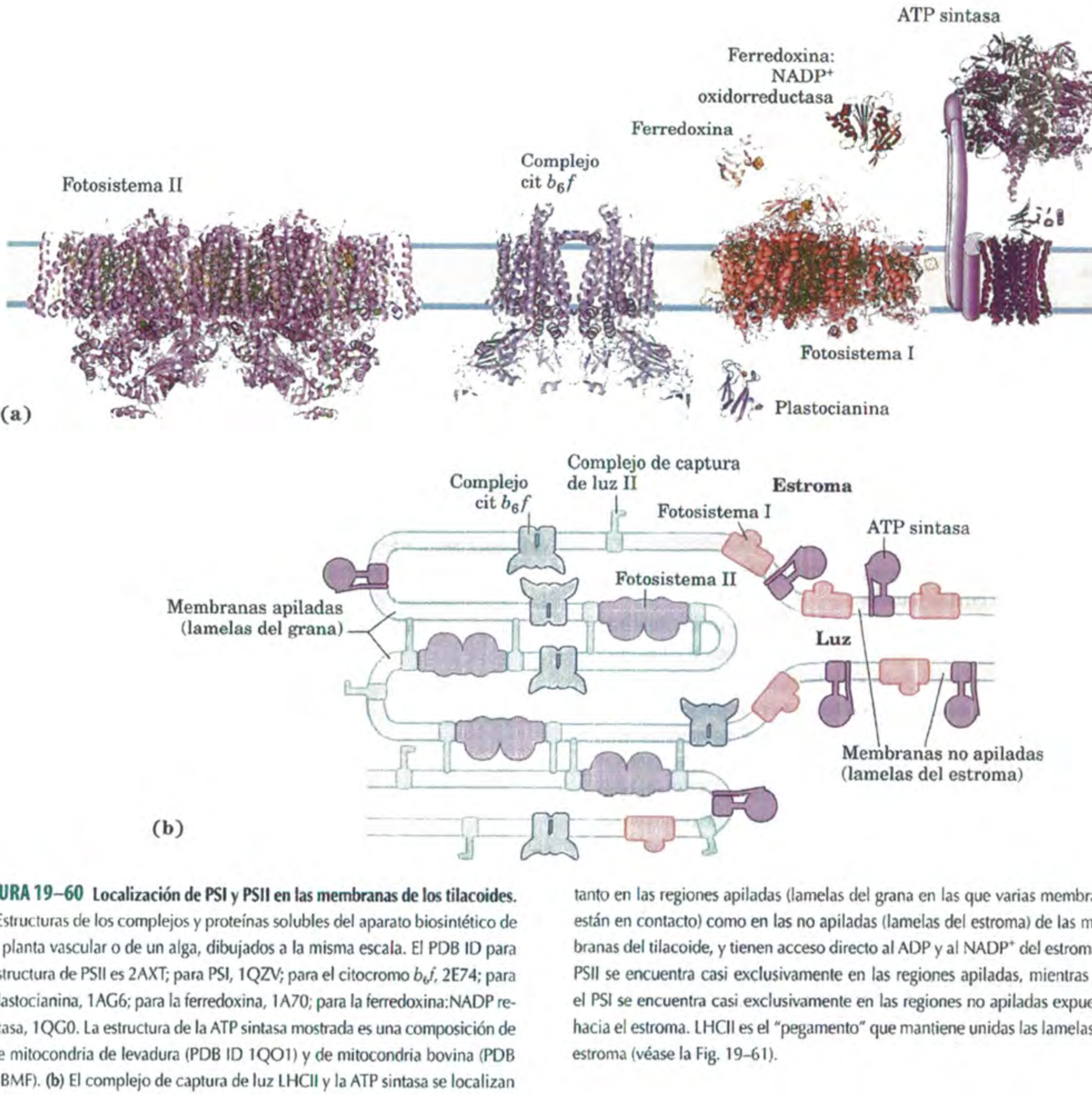


FIGURA 19–60 Localización de PSI y PSII en las membranas de los tilacoides. (a) Estructuras de los complejos y proteínas solubles del aparato biosintético de una planta vascular o de un alga, dibujados a la misma escala. El PDB ID para la estructura de PSII es 2AXT; para PSI, 1QZV; para el citocromo b_6f, 2E74; para la plastocianina, 1AG6; para la ferredoxina, 1A70; para la ferredoxina:NADP reductasa, 1QG0. La estructura de la ATP sintasa mostrada es una composición de la de mitocondria de levadura (PDB ID 1QO1) y de mitocondria bovina (PDB ID 1BMF). (b) El complejo de captura de luz LHCII y la ATP sintasa se localizan tanto en las regiones apiladas (lamelas del grana en las que varias membranas están en contacto) como en las no apiladas (lamelas del estroma) de las membranas del tilacoide, y tienen acceso directo al ADP y al NADP⁺ del estroma. El PSII se encuentra casi exclusivamente en las regiones apiladas, mientras que el PSI se encuentra casi exclusivamente en las regiones no apiladas expuestas hacia el estroma. LHCII es el "pegamento" que mantiene unidas las lamelas del estroma (véase la Fig. 19–61).

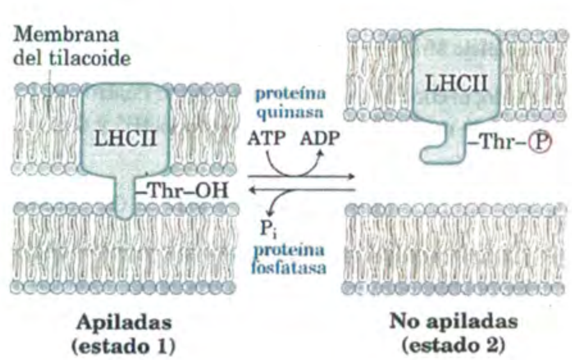


FIGURA 19–61 Equilibrio del flujo de electrones en PSI y PSII por transición de estado. Un dominio hidrofóbico de LHCII en una lamela de los tilacoides se inserta en la lamela vecina y mantiene las dos membranas en yuxtaposición (estado 1). La acumulación de plastoquinol (no mostrada) estimula una proteína quinasa que fosforila un residuo Thr del dominio hidrofóbico de LHCII, lo cual reduce su afinidad por la membrana del tilacoide vecina, convirtiendo las regiones apiladas en regiones no apiladas (estado 2). Una proteína fosfatasa específica invierte esta fosforilación reguladora cuando aumenta la relación $[PQ]/[PQH_2]$.

un electrón para volver a su estado basal en preparación para la captura de otro fotón. En principio, el electrón requerido podría provenir de un gran número de compuestos orgánicos o inorgánicos. Las bacterias fotosintéticas utilizan diversos dadores electrónicos con este fin (acetato, succinato, malato o sulfuro) según su disponibilidad en un nicho ecológico determinado. Hace unos tres mil millones de años, la evolución de las bacterias fotosintéticas primitivas (los progenitores de las cianobacterias actuales) produjeron un fotosistema capaz de tomar electrones de un dador que está siempre disponible: el

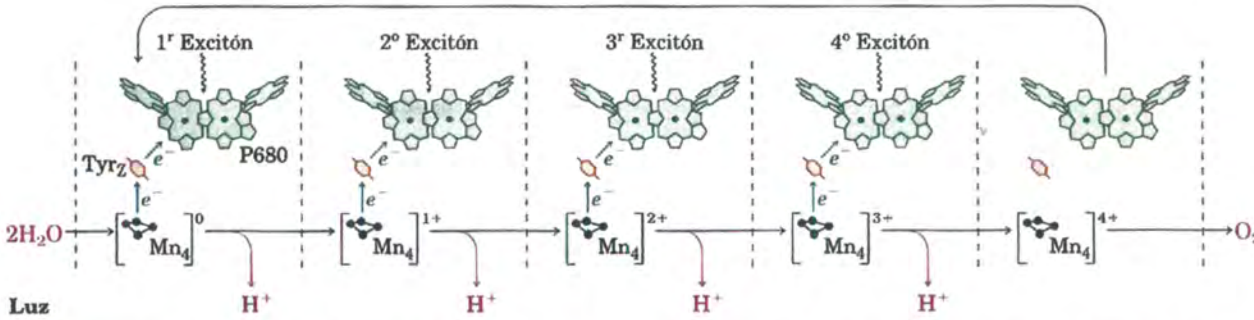


FIGURA 19–62 Actividad de escisión del agua del complejo que desprende oxígeno. Se muestra aquí el proceso que genera un agente oxidante de cuatro electrones, un centro multinuclear con varios iones Mn, en el complejo que escinde el agua de PSII. La absorción secuencial de cuatro fotones (excitones), en la que cada absorción provoca la pérdida de un electrón del centro Mn, produce un agente oxidante que puede eliminar cuatro electrones de dos moléculas de agua, produciendo O_2. Los electrones perdidos por el centro Mn pasan, de uno en uno, a un residuo Tyr oxidado en una proteína de PSII y después a $P680^+$.

agua. Se rompen dos moléculas de agua, que dan cuatro electrones, cuatro protones y oxígeno molecular:

$$2H_2O \longrightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$$

Un fotón aislado de luz visible no posee energía suficiente para romper los enlaces del agua; para esta reacción de rotura fotolítica se necesitan cuatro fotones.

Los cuatro electrones extraídos del agua no pasan directamente al $P680^+$, que sólo puede aceptar un electrón cada vez. En su lugar es un notable sistema molecular, el **complejo desprendedor de oxígeno** (también llamado **complejo de escisión del agua**), el que pasa cuatro electrones *de uno en uno* al $P680^+$ **(Fig. 19–62)**. El dador electrónico inmediato al $P680^+$ es un residuo Tyr (a menudo representado mediante el símbolo Z o Tyr_Z) de la subunidad proteica D1 del centro de reacción de PSII. El residuo Tyr pierde un protón y un electrón, generando un radical libre de Tyr eléctricamente neutro, ˙Tyr:

$$4P680^+ + 4\ Tyr \longrightarrow 4P680 + 4\ ^{\cdot}Tyr \quad (19\text{–}13)$$

El radical Tyr recupera su electrón y protón perdidos por oxidación de un agrupamiento de cuatro iones manganeso en el complejo de escisión del agua. Con cada transferencia electrónica sencilla, el agrupamiento de Mn queda más oxidado; cuatro transferencias electrónicas simples, correspondiente cada una a la absorción de un fotón, produce una carga de 4+ sobre el complejo de Mn (Fig. 19–62):

$$4\ ^{\cdot}Tyr + [\text{complejo Mn}]^0 \longrightarrow 4\ Tyr + [\text{complejo Mn}]^{4+} \quad (19\text{–}14)$$

En este estado, el complejo de Mn puede tomar cuatro electrones de un par de moléculas de agua, liberando $4H^+$ y O_2:

$$[\text{complejo Mn}]^{4+} + 2H_2O \longrightarrow [\text{complejo Mn}]^0 + 4H^+ + O_2 \quad (19\text{–}15)$$

Ya que los cuatro protones producidos en esta reacción se liberan en la luz del tilacoide, el complejo liberador de oxígeno actúa como una bomba de protones, impulsada por transferencia de electrones. La suma de las Ecuaciones 19–12 a 19–15 es

$$2H_2O + 2PQ_B + 4\ \text{fotones} \longrightarrow O_2 + 2PQ_BH_2 \quad (19\text{–}16)$$

El complejo de escisión del agua está asociado con una proteína periférica de membrana (M_r 33.000) del lado de la luz del tilacoide que estabiliza el agrupamiento de cuatro iones Mn (en diversos estados de oxidación), un ión Ca^{2+}, cinco átomos de O y un ión Cl^- con una geometría precisa. No se conocen bien los cambios químicos que tienen lugar, pero su química es esencial para la vida en la tierra y es de gran interés tanto por su significado biológico como por el reto que representa para la química bioinorgánica. El manganeso puede existir en estados de oxidación estables desde +2 a +7, por lo que un agrupamiento de cuatro iones Mn puede ciertamente dar o aceptar cuatro electrones. La determinación de la estructura del centro polimetálico ha inspirado varias hipótesis razonables sujetas a comprobación.

RESUMEN 19.8 El acontecimiento fotoquímico central: el flujo electrónico impulsado por la luz

- Las bacterias tiene un único centro de reacción; en las bacterias púrpura es del tipo feofitina-quinona, y en bacterias verdes del azufre del tipo Fe–S.
- Los estudios estructurales del centro de reacción de una bacteria púrpura han proporcionado información sobre el flujo impulsado por la luz desde un par especial de moléculas de clorofila excitadas, a través de la feofitina, a las quinonas. A continuación, los electrones pasan desde las quinonas a través del complejo del citocromo bc_1 y vuelven al centro de fotorreacción.
- Una vía alternativa en las bacterias verdes del azufre envía los electrones desde las quinonas reducidas al NAD^+.
- Las cianobacterias y las plantas tienen dos centros de fotorreacción diferentes que funcionan en tándem.
- El fotosistema I de plantas pasa electrones desde su centro de reacción excitado, el P700, a través de una serie de transportadores a la ferredoxina, que reduce el $NADP^+$ a NADPH.
- El centro de reacción del fotosistema II de plantas, P680, pasa electrones a la plastoquinona y los electrones perdidos del P680 son reemplazados por electrones del H_2O (en otros organismos se utilizan dadores de electrones diferentes del H_2O).
- El flujo de electrones a través de los fotosistemas produce NADPH y ATP, en una proporción aproximada de 2:3. Un segundo tipo de flujo electrónico (flujo cíclico) sólo produce ATP y permite que exista una variabilidad en las proporciones de NADPH y ATP formados.

- La localización de PSI y PSII entre las lamelas de los grana y del estroma puede cambiar y está controlada indirectamente por la intensidad de la luz; se optimiza la distribución de excitones para la captura eficiente de energía.
- La rotura del H_2O impulsada por la luz está catalizada por un complejo proteico que contienen Mn; se produce O_2. La plastoquinona reducida transporta electrones al complejo del citocromo b_6f; de ahí los electrones pasan a la plastocianina y a continuación al P700, donde reemplazan a los que se perdieron durante su fotoexcitación.
- El flujo de electrones a través del complejo del citocromo b_6f impulsa los protones a través de la membrana plasmática, creando una fuerza protón-motriz que proporciona la energía para la síntesis de ATP por una ATP sintasa.

19.9 Síntesis de ATP por fotofosforilación

Las actividades combinadas de los dos fotosistemas de plantas transportan electrones desde el agua al $NADP^+$, conservando parte de la energía de la luz absorbida en forma de NADPH (Fig. 19–56). Simultáneamente se bombean protones a través de las membranas de los tilacoides y la energía se conserva en forma de potencial electroquímico. A continuación veremos el proceso por el cual este gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP, el otro producto conservador de la energía de las reacciones dependientes de luz.

En 1954 Daniel Arnon y colaboradores descubrieron que el ATP se genera a partir del ADP y del P_i durante la transferencia electrónica fotosintética en cloroplastos de espinaca iluminados. Estos hallazgos recibieron el apoyo del trabajo de Albert Frenkel, quien detectó la producción de ATP dependiente de la luz en estructuras membranosas que contenían pigmentos denominadas **cromatóforos**, procedentes de bacterias fotosintéticas. Los investigadores concluyeron parte de la energía luminosa capturada por los sistemas fotosintéticos de estos organismos se transforma en energía del enlace fosfato del ATP. Este proceso se denomina **fotofosforilación,** para distinguirlo de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias que respiran.

Daniel Arnon, 1910–1994

Un gradiente de protones acopla el flujo electrónico con la fosforilación

Varias propiedades de la transferencia electrónica fotosintética y de la fotofosforilación en cloroplastos indican que un gradiente de protones juega el mismo papel que el que juega que en la fosforilación oxidativa mitocondrial: (1) los centros de reacción, transportadores electrónicos y enzimas formadores de ATP están localizados en una membrana impermeable a los protones, la membrana del tilacoide, que ha de estar intacta para llevar a cabo la fotofosforilación. (2) Se puede desacoplar la fotofosforilación del flujo electrónico mediante reactivos que promueven el paso de protones a través de la membrana del tilacoide. (3) Se puede bloquear la fotofosforilación por la venturicidina y otros agentes similares que inhiben la formación de ATP a partir de ADP y P_i por la ATP sintasa de las mitocondrias (Tabla 19–4). (4) la síntesis de ATP es catalizada por complejos F_oF_1 localizados en la superficie exterior de la membrana del tilacoide, que son de estructura y función muy parecidas a las de los complejos F_oF_1 de las mitocondrias.

Las moléculas transferidoras de electrones en la cadena de transportadores que interconecta PSII con PSI están orientadas de forma asimétrica en la membrana del tilacoide, por lo que el flujo de electrones fotoinducido da lugar a un movimiento neto de protones a través de la membrana, desde lado del estroma a la luz del tilacoide **(Fig. 19–63)**. En 1966 André Jagendorf demostró que un gradiente de pH a través de la membrana del tilacoide (exterior alcalino) podía proporcionar la fuerza motriz para generar ATP. Sus observaciones iniciales proporcionaron algunas de las pruebas experimentales más importantes en favor de la hipótesis quimiosmótica de Mitchell.

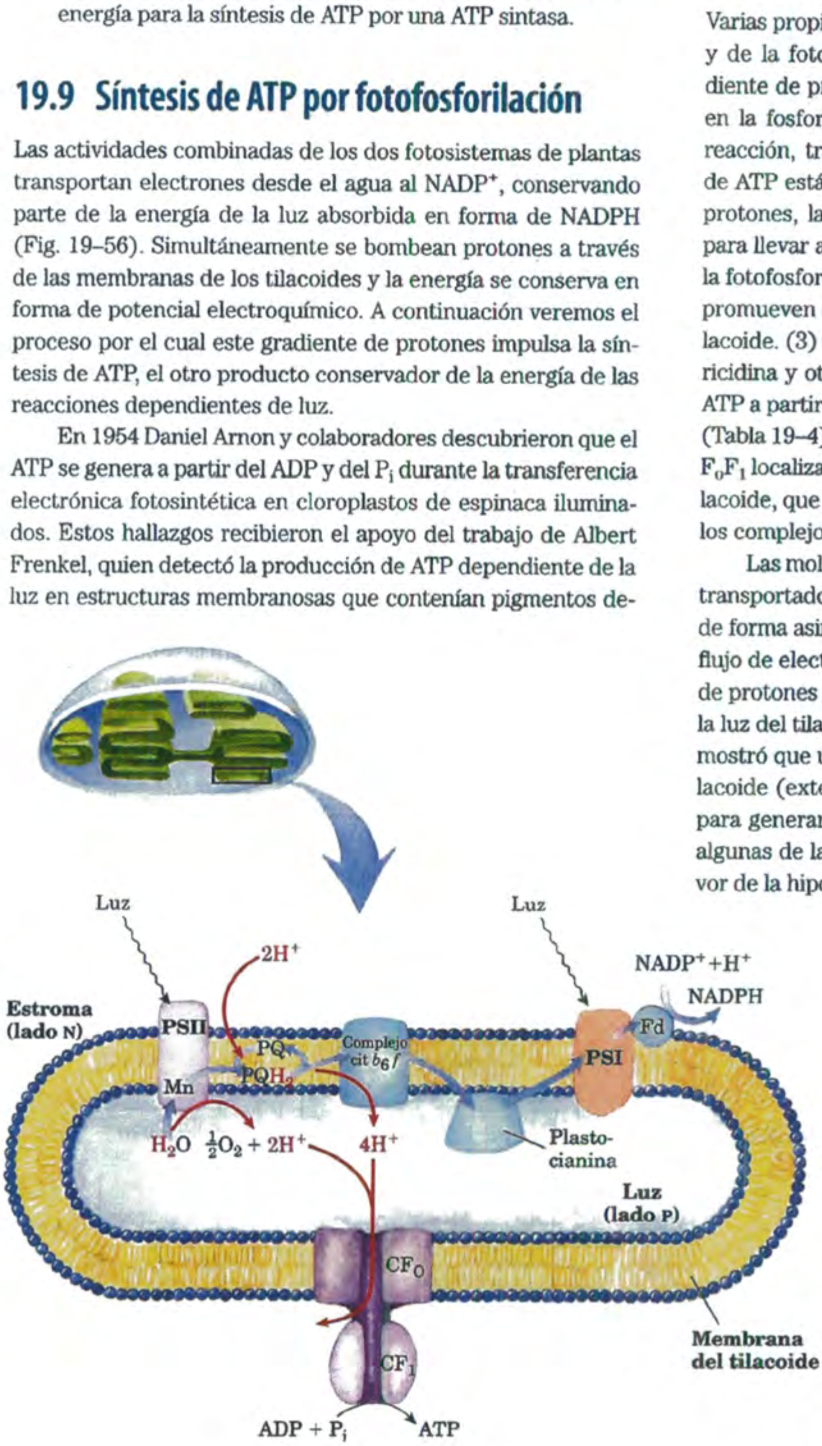


FIGURA 19–63 Circuitos de protones y electrones en los tilacoides. Los electrones (flechas azules) se desplazan desde el H_2O a través de PSII, la cadena de transportadores intermedios, PSI y finalmente al $NADP^+$. Los protones (flechas rojas) se bombean a la luz del tilacoide por el flujo de electrones a través de la cadena de transportadores que unen PSII y PSI, y vuelven a entrar en el estroma a través de canales protónicos formados por la porción F_o (designada CF_o) de la ATP sintasa. La subunidad F_1 (CF_1) cataliza la síntesis de ATP.

André Jagendorf

Jagendorf incubó cloroplastos, en la oscuridad, en un tampón de pH 4, el cual penetró lentamente en el compartimiento interno de los tilacoides disminuyendo su pH interno. Añadió ADP y P_i a la suspensión oscura de cloroplastos y a continuación elevó de forma repentina el pH del medio externo hasta 8, creándose momentáneamente un gran gradiente de pH a través de la membrana. A medida que los protones salían desde los tilacoides hacia el medio, se generaba ATP a partir de ADP y P_i. Debido a que la formación tenía lugar en la oscuridad (sin aporte de energía luminosa), este experimento demostró que un gradiente de pH a través de una membrana constituye un estado de energía elevada que puede, al igual que en la fosforilación oxidativa mitocondrial, facilitar la transducción de la energía de la transferencia de electrones en energía química del ATP.

Se ha establecido la estequiometría aproximada de la fotofosforilación

A medida que se desplazan los electrones desde el agua al $NADP^+$ en los cloroplastos de plantas, se mueven unos 12 H^+ desde el estroma a la luz del tilacoide por cada cuatro electrones pasados (es decir, por cada O_2 formado). Cuatro de esos protones se desplazan por el complejo que desprende oxígeno, y hasta ocho por el complejo del citocromo b_6f. El resultado cuantitativo es una diferencia de 1.000 veces en la concentración de protones a través de la membrana del tilacoide ($\Delta pH = 3$). La energía que se almacena en un gradiente de protones (el potencial electroquímico) tiene dos componentes: una diferencia en concentración de protones (ΔpH) y un potencial eléctrico ($\Delta\psi$) originado en la separación de cargas. En los cloroplastos, el componente dominante es ΔpH; aparentemente el movimiento de contraiones disipa la mayor parte del potencial eléctrico. En cloroplastos iluminados, la energía almacenada en el gradiente de protones por mol de protones es

$$\Delta G = 2{,}3RT\Delta \text{pH} + Z\mathcal{F}\Delta\psi = -17 \text{ kJ/mol}$$

de tal modo que el movimiento de 12 moles de protones a través de la membrana del tilacoide representa la conservación de aproximadamente 200 kJ de energía, suficiente para impulsar las síntesis de varios moles de ATP ($\Delta G'^{\circ} = 30{,}5$ kJ/mol). Las medidas experimentales dieron valores de unos 3 ATP por O_2 producido.

Para dirigir cuatro electrones desde el H_2O al NADPH se han de absorber al menos ocho fotones (un fotón por electrón en cada centro de reacción). La energía de ocho fotones de luz visible es más que suficiente para generar la síntesis de 3 moléculas de ATP.

La síntesis de ATP no es la única reacción de conservación de la energía de la fotosíntesis en las plantas; el NADPH formado en la transferencia electrónica final también es rico energéticamente, al igual que lo es su análogo próximo NADH. La reacción global para la fotofosforilación no cíclica (un término que se explica más adelante) es

$$2H_2O + 8 \text{ fotones} + 2NADP^+ + \sim 3ADP + \sim 3P_i \longrightarrow O_2 + \sim 3ATP + 2NADPH \quad (19\text{–}17)$$

La ATP sintasa de los cloroplastos es como la de la mitocondria

El enzima responsable de la síntesis de ATP en los cloroplastos es un gran complejo con dos componentes funcionales, CF_o y CF_1 (la *C* denota la localización, los cloroplastos). CF_o es un poro protónico transmembrana compuesto por varias proteínas integrales de membrana y es homólogo del F_o mitocondrial. CF_1 es un complejo de proteína periférica de membrana muy similar en composición de subunidades, estructura y función a la F_1 mitocondrial.

La microscopia electrónica de cloroplastos seccionados muestra complejos de ATP sintasa en forma de proyecciones en forma de pomo en la superficie *exterior* (del estroma o N) de las membranas de los tilacoides que se corresponden con los complejos de ATP sintasa que se proyectan sobre la superficie *interior* (matriz o N) de la membrana mitocondrial interna. Así, la relación entre la orientación de la ATP sintasa y la dirección del bombeo de protones es la misma en los cloroplastos y en las mitocondrias. En ambos casos la porción F_1 de la ATP sintasa está localizada en el lado más alcalino (N) de la membrana a través de la que fluyen los protones a favor de su gradiente de concentración; la dirección del flujo de protones en relación a F_1 es la misma en ambos casos: de P a N **(Fig. 19–64)**.

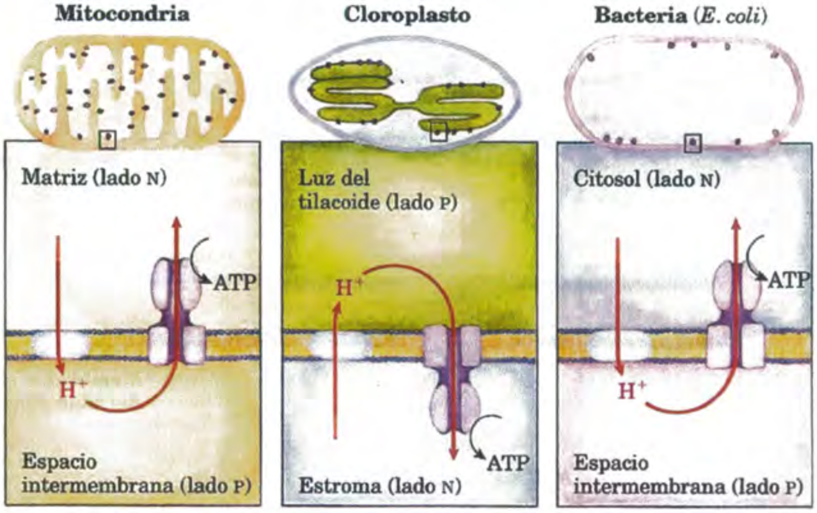


FIGURA 19–64 Comparación de la topología del movimiento de protones y orientación de la ATP sintasa en las membranas mitocondriales, de cloroplastos y de la bacteria *E. coli*. En cada caso, la orientación del gradiente de protones respecto a la ATP sintasa es la misma.

Se cree que el mecanismo de la ATP sintasa de cloroplastos es también esencialmente idéntico al de su análogo mitocondrial; ADP y P_i se condensan fácilmente para formar ATP sobre la superficie del enzima, y la liberación de este ATP ligado al enzima requiere una fuerza protón-motriz. La catálisis rotacional ocupa secuencialmente cada una de las tres subunidades β de la ATP sintasa en la síntesis de ATP, liberación de ATP y unión de ADP + P_i (Figs. 19–26, 19–27).

RESUMEN 19.9 Síntesis de ATP y fotofosforilación

- En las plantas, tanto la reacción de rotura del agua como el flujo electrónico a través del complejo del citocromo b_6f van acompañados del bombeo de protones a través de la membrana del tilacoide. La fuerza protón-motriz así creada impulsa la síntesis de ATP por un complejo CF_oCF_1 similar al complejo F_oF_1 de la mitocondria.
- La ATP sintasa de los cloroplastos (CF_oCF_1) es muy similar, tanto en estructura como mecanismo catalítico, a las ATP sintasas de mitocondrias y bacterias. La rotación física impulsada por el gradiente de protones se acompaña de la síntesis de ATP en sitios que se ciclan a través de tres conformaciones, una con alta afinidad por el ATP, otras con alta afinidad por el ADP + P_i y una tercera con baja afinidad por ambos nucleótidos.

19.10 Evolución de la fotosíntesis oxigénica

La aparición de la fotosíntesis oxigénica sobre la tierra hace 2.500 millones de años fue un acontecimiento crucial en la evolución de la biosfera. Hasta aquel momento, carecía prácticamente de oxígeno molecular y estaba desprovista de una capa de ozono para proteger a los organismos vivos de la radiación UV solar. La fotosíntesis oxigénica puso a disposición un suministro casi ilimitado de un agente reductor para impulsar la producción de compuestos orgánicos mediante reacciones biosintéticas reductoras. También aparecieron mecanismos que permitieron a los organismos utilizar O_2 como aceptor electrónico terminal en transferencias de electrones muy energéticas a partir de sustratos orgánicos, empleando la energía de oxidación para sostener su metabolismo. El complejo aparato fotosintético de una planta vascular es la culminación de una serie de acontecimientos evolutivos, el más reciente de los cuales fue la adquisición por parte de las células eucarióticas de una cianobacteria endosimbionte.

Los cloroplastos evolucionaron a partir de bacterias fotosintéticas

Los cloroplastos de los organismos modernos se parecen a las mitocondrias en varias propiedades y se cree que se originaron por el mismo mecanismo que dio lugar a las mitocondrias: la endosimbiosis. Al igual que las mitocondrias los cloroplastos, contienen su propio DNA y su maquinaria sintetizadora de proteínas. Algunos polipéptidos de las proteínas de los cloroplastos están codificados por genes de los cloroplastos y se sintetizan en los mismos; otros están codificados en genes nucleares, se sintetizan fuera de los cloroplastos y son importadas a los mismos (Capítulo 27). Cuando las células vegetales crecen y se dividen, los cloroplastos dan lugar a nuevos cloroplastos por división durante la cual se replica su DNA, dividiéndose entre los cloroplastos resultantes. En las cianobacterias modernas la maquinaria y los mecanismos para la captura de la luz, el flujo electrónico y la síntesis de ATP son parecidos en muchos aspectos a los de los cloroplastos de las plantas. Estas observaciones condujeron a la hipótesis ampliamente aceptada en la actualidad de que los progenitores evolutivos de las células vegetales modernas eran eucariotas primitivos que engulleron bacterias fotosintéticas y establecieron una relación endosimbiótica estable entre ellos (véase la Fig. 1–36).

Al menos la mitad de la actividad fotosintética de la Tierra se da actualmente en microorganismos: algas, otros eucariotas fotosintéticos y bacterias fotosintéticas. Las cianobacterias tienen PSII y PSI en tándem, y PSII tiene una actividad asociada de escisión de agua similar a la de plantas. Sin embargo, los grupos restantes de bacterias fotosintéticas tienen un único centro de reacción y no parten el H_2O ni producen O_2. Muchas son anaerobios obligados que no pueden tolerar el O_2; han de utilizar un compuesto diferente del H_2O como dador de electrones. Algunas bacterias fotosintéticas utilizan compuestos inorgánicos como dadores de electrones (e hidrógeno). Por ejemplo, las bacterias verdes del azufre utilizan sulfuro de hidrógeno:

$$2H_2S + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2S$$

Estas bacterias en lugar de desprender O_2 molecular, producen azufre elemental como producto de oxidación del H_2S. (Después continúan oxidándolo a SO_4^{2-}.) Otras bacterias fotosintéticas utilizan compuestos orgánicos como dadores de electrones, por ejemplo, lactato:

$$2\ \text{Lactato} + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\ \text{piruvato}$$

La fotosíntesis en las plantas y en las bacterias son procesos fundamentalmente similares a pesar de las diferencias en los dadores de hidrógeno que utilizan. Esta similitud se hace más evidente cuando se escribe la ecuación de la fotosíntesis en una forma más general:

$$2H_2D + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2D$$

en la que H_2D representa un dador de electrones (e hidrógeno) y D es su forma oxidada. H_2D puede ser agua, sulfuro de hidrógeno, lactato o algún otro compuesto orgánico según la especie. Es muy probable que las bacterias que desarrollaron en primer lugar la capacidad fotosintética utilizasen H_2S como su fuente de electrones.

Los parientes antiguos de las cianobacterias modernas aparecieron probablemente a causa de la combinación de material genético de dos tipos de bacterias fotosintéticas, con sistemas del tipo visto en las bacterias púrpura modernas (con una ruta electrónica del tipo PSII) y en las bacterias verdes del azufre (con una ruta para los electrones parecida a PSI). La bacteria con dos fotosistemas independientes pudo haber utilizado uno en un conjunto de condiciones y el otro en condiciones diferentes. Con el tiempo apareció un mecanismo que conectó ambos fotosistemas para su uso simultáneo, al tiempo que el sistema ti-

po PSII adquirió la capacidad de escisión del agua que se encuentra en las cianobacterias modernas.

Las cianobacterias modernas pueden sintetizar ATP por fosforilación oxidativa o por fotofosforilación, aunque no tienen ni mitocondrias ni cloroplastos. La maquinaria enzimática para ambos procesos se encuentra en una membrana plasmática con muchos repliegues (véase la Fig. 1–6). En ambos procesos funcionan tres componentes proteicos, lo que es prueba de que los procesos tienen un origen evolutivo común **(Fig. 19–65)**. Primero, el complejo de bombeo de protones del citocromo b_6f transporta electrones desde la plastoquinona al citocromo c_6 en la fotosíntesis y también transporta electrones desde la ubiquinona al citocromo c_6 en la fosforilación oxidativa, papel desempeñado por el citocromo bc_1 en la mitocondria. Segundo, el citocromo c_6, homólogo del citocromo *c* mitocondrial, transporta electrones desde el Complejo III al Complejo IV en las cianobacterias; también puede transportar electrones desde el complejo del citocromo b_6f a PSI, una función realizada en las plantas por la plastocianina. Vemos, por tanto, la homología funcional entre el complejo del citocromo b_6f cianobacteriano y el complejo del citocromo bc_1 mitocondrial, y entre el citocromo c_6 cianobacteriano y la plastocianina de plantas. El tercer componente conservado es la ATP sintasa, que funciona en la fosforilación oxidativa y en la fotofosforilación en las cianobacterias y en las mitocondrias y cloroplastos de los eucariotas fotosintéticos. La estructura y el notable mecanismo de este enzima se han conservado cuidadosamente a lo largo de la evolución.

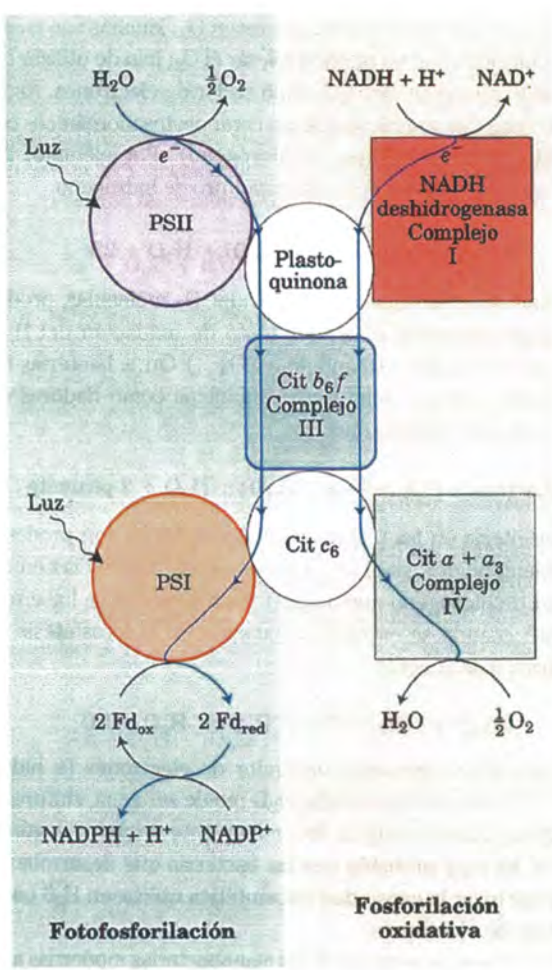


FIGURA 19–65 Los papeles duales del citocromo b_6f y del citocromo c_6 en cianobacterias reflejan orígenes evolutivos. Las cianobacterias utilizan el citocromo b_6f, el citocromo c_6 y la plastoquinona tanto en la fosforilación oxidativa como en la fotofosforilación. **(a)** En la fotofosforilación, los electrones fluyen (parte superior a parte inferior) desde el agua hacia el $NADP^+$. **(b)** En la fosforilación oxidativa, los electrones fluyen desde el NADH hacia el O_2. Ambos procesos están acompañados por movimiento de protones a través de la membrana, efectuado por un ciclo Q.

En *Halobacterium*, una única proteína absorbe luz y bombea protones para impulsar la síntesis de ATP

En algunas arqueobacterias modernas ha aparecido un mecanismo totalmente diferente para convertir la energía de la luz en un gradiente electroquìmico. La arqueobacteria halófila (que le "gusta la sal") *Halobacterium salinarum* desciende de progenitores evolutivos muy antiguos. Esta arqueobacteria (comúnmente denominada halobacteria) sólo vive en estanques y lagos salados (Great Salt Lake y el mar Muerto, por ejemplo), en donde las elevadas concentraciones de sal, que pueden ser superiores a 4 M, son resultado de la pérdida de agua por evaporación; en realidad las halobacterias no pueden vivir a concentraciones de NaCl inferiores a 3 M. Estos organismos son aeróbicos y normalmente utilizan O_2 para oxidar moléculas combustibles orgánicas. No obstante, la solubilidad del O_2 es tan baja en los estanques salados que algunas veces el metabolismo oxidativo se ha de complementar con luz solar como fuente alternativa de energía.

La membrana plasmática de *H. salinarum* contiene pequeñas extensiones del pigmento que absorbe luz **bacteriorrodopsina,** que contiene retinal (el aldehído derivado de la vitamina A; véase la Fig. 10–21) como grupo prostético colector de luz. Cuando se iluminan las células, el todo-*trans*-retinal unido a la bacteriorrodopsina absorbe un fotón y experimenta una fotoisomerización a 13-*cis*-retinal que fuerza un cambio de conformación de la proteína. El restablecimiento del todo-*trans*-retinal es simultáneo a la salida de protones al exterior a través de la membrana plasmática.

La bacteriorrodopsina, con sólo 247 residuos aminoácidos, es la bomba de protones impulsada por la luz más sencilla que se conoce. La diferencia en estructura tridimensional entre la bacteriorrodopsina en la oscuridad y después de la iluminación **(Fig. 19–66a)** sugiere una vía por la cual una serie de "saltos" concertados de protones puede transportar efectivamente un protón a través de la membrana. El cromóforo retinal se une mediante una base de Schiff al grupo ε-amino de un residuo Lys. En la oscuridad el nitrógeno de esta base de Schiff se encuentra protonado; en la luz, la fotoisomerización del retinal disminuye el pK_a de este grupo y cede su protón a un residuo Asp vecino, desencadenando una serie de saltos de protones que finalmente provocan la liberación de un protón en la superficie exterior de la membrana (Fig. 19–66b).

El potencial electroquímico a través de la membrana impulsa los protones de nuevo al interior de la célula a través de un complejo ATP sintasa de la membrana muy parecido al de mitocondrias y cloroplastos. De este modo, las halobacterias pueden utilizar la luz para suplementar el ATP sintetizado en la

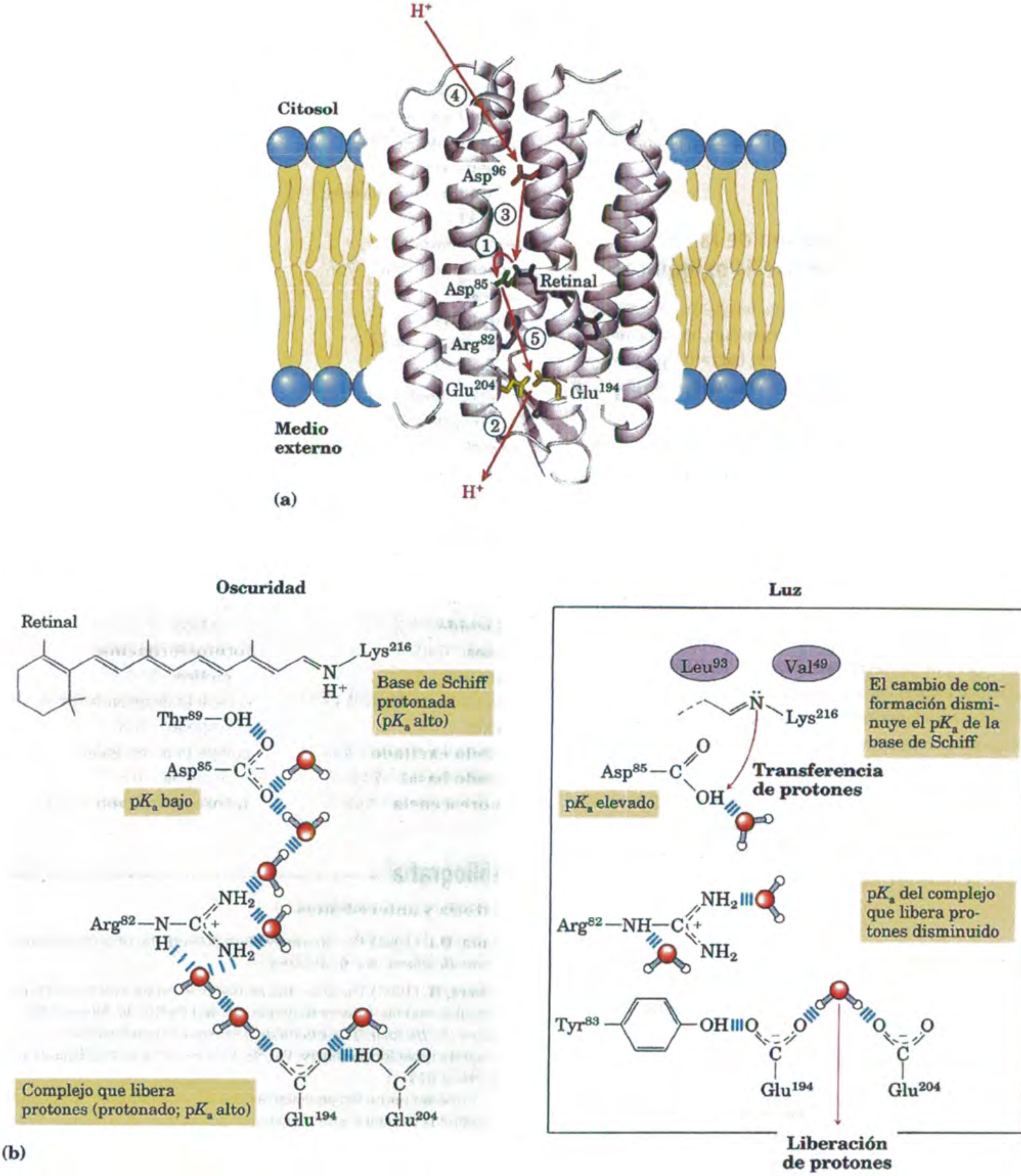


FIGURA 19–66 Evolución de un segundo mecanismo para el bombeo de protones impulsado por la luz en una arqueobacteria halófila. **(a)** La bacteriorrodopsina (M_r 26.000) de *Halobacterium halobium* tiene siete hélices α que abarcan la membrana (PDB ID 1C8R). El cromóforo todo-*trans*-retinal (púrpura) está unido covalentemente mediante una base de Schiff al grupo ε-amino de un residuo Lys en el interior profundo de la membrana. Una serie de residuos Asp y Glu y una serie de moléculas de agua estrechamente asociadas se distribuyen a lo largo de la proteína que aportan la vía transmembrana para los protones (flechas rojas). Los pasos ① a ⑤ indican los movimientos de protones, descritos más adelante.

(b) En la oscuridad (panel izquierdo), la base de Schiff está protonada. La iluminación (panel derecho) fotoisomeriza el retinal, generando cambios sutiles de conformación en la proteína que alteran la distancia entre la base de Schiff y los residuos aminoácidos vecinos. La interacción con estos vecinos disminuye el pK_a de la base de Schiff protonada, y la base cede su protón a un grupo carboxilo próximo del Asp^{85} (paso ① en **(a)**). Ello inicia una serie de saltos de protones concertados entre moléculas de agua (véase la Fig. 2–13) en el interior de la proteína, que acaba con ② la liberación de un protón que estaba compartido por Glu^{194} y Glu^{204} cercanos a la superficie extracelular. ③ La base de Schiff readquiere un protón desde el Asp^{96}, que a su vez ④ toma un protón del citosol. ⑤ Finalmente, el Asp^{85} cede su protón, dando lugar a la reprotonación del par Glu^{204}–Glu^{194}. El sistema vuelve a estar listo para otra ronda de bombeo de protones.

fosforilación oxidativa cuando el O_2 es limitado. Las halobacterias no desprenden O_2 ni llevan a cabo la fotorreducción del $NADP^+$; su maquinaria de fototransducción es, por tanto, mucho más sencilla que la de las cianobacterias o la de las plantas. No obstante, el mecanismo de bombeo protónico puede constituir un prototipo de otras bombas de iones más complejas.

Bacteriorrodopsina

RESUMEN 19.10 Evolución de la fotosíntesis oxigénica

- Las cianobacterias modernas proceden de un organismo antiguo que adquirió dos fotosistemas, uno del tipo del que se encuentra actualmente en las bacterias púrpura y el otro del tipo que se encuentra en las bacterias verdes del azufre.
- Muchos microorganismos fotosintéticos obtienen electrones para la fotosíntesis no del agua sino de dadores tales como el H_2S.
- Las cianobacterias con los fotosistemas en tándem y una actividad de escisión del agua que libera oxígeno a la atmósfera aparecieron en la Tierra hace unos 2.500 millones de años.
- Los cloroplastos, al igual que las mitocondrias, evolucionaron a partir de bacterias que vivían endosimbióticamente dentro de células eucarióticas primitivas. Las ATP sintasas de bacterias, cianobacterias, mitocondrias y cloroplastos comparten un precursor evolutivo común así como un mecanismo enzimático común.
- Un mecanismo completamente diferente para convertir la energía luminosa en un gradiente de protones apareció en las arqueobacterias modernas en la que el pigmento colector de la luz es el retinal.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

Bibliografía

Historia y antecedentes

Arnon, D.I. (1984) The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 258–262.

Beinert, H. (1995) These are the moments when we live! From Thunberg tubes and manometry to phone, fax and FedEx. In *Selected Topics in the History of Biochemistry: Personal Recollections*, Comprehensive Biochemistry, Vol. 38, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Atractiva narración personal del fascinante período en el que se descubrió la bioquímica del transporte electrónico respiratorio.

Blankenship, R.E. (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, Blackwell Science Inc., London.

Discusión de nivel intermedio de todos los aspectos de la fotosíntesis.

Govindjee, Beatty, J.T., Gest, H., & Allen, J.F. (eds). (2006) *Discoveries in Photosynthesis*, Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 20, Springer Verlag, Dordrecht, The Netherlands.

Maravillosa descripción de la base histórica para los descubrimientos en la fotosíntesis, explicado por gente que hizo esta historia.

Harold, F.M. (1986) *The Vital Force: A Study in Bioenergetics*, W. H. Freeman and Company, New York.

Síntesis fácil de leer sobre los principios de la bioenergética y su aplicación a las transducciones de energía.

Heldt, H.-W. (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, Oxford.

Libro de texto de bioquímica de plantas con excelentes discusiones sobre la fotofosforilación.

Keilin, D. (1966) *The History of Cell Respiration and Cytochrome*, Cambridge University Press, London.

Descripción autorizada del descubrimiento de los citocromos y de su papel en la respiración, escrito por el descubridor de los citocromos.

Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L. (2004) Britton Chance: Olympian and developer of stop-flow methods. *J. Biol. Chem.* **279**, e10, www.jbc.org.

Un clásico del JBC (en el sitio web sobre "Artículos clásicos") que describe la tecnología utilizada para determinar la secuencia de los transportadores de electrones.

Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L. (2006) Forty years of superoxide dismutase research: the work of Irwin Fridovich. *J. Biol. Chem.* **281**, e17, www.jbc.org.

Un Artículo clásico del JBC.

Lane, N. (2005) *Power, Sex, Suicide: Mitochondria and the Meaning of Life*, Oxford University Press, Oxford.

Descripción introductoria sobre las funciones de la mitocondria en la conservación de la energía y en la apoptosis.

Mitchell, P. (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* **206**, 1148–1159.

Conferencia Nobel del autor en la que se bosqueja la evolución de la hipótesis quimiosmótica.

Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J. (2002) *Bioenergetics 3*, Academic Press, Amsterdam.

Tratado puesto al día, completo y bien ilustrado sobre todos los aspectos de transducción de energía mitocondrial y de los cloroplastos. Tratado avanzado.

Scheffler, I.E. (1999) *Mitochondria*, Wiley-Liss, New York.

Excelente revisión de la estructura y función e las mitocondrias.

Slater, E.C. (1987) The mechanism of the conservation of energy of biological oxidations. *Eur. J. Biochem.* **166**, 489–504.

Descripción y crítica de la evolución del modelo quimiosmótico.

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Reacciones de transferencia de electrones en las mitocondrias

Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol.* **27**, 639–645.

Babcock, G.T. & Wikström, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**, 301–309.

Discusión avanzada sobre la reducción del agua y el bombeo de protones por la citocromo oxidasa.

Boekema, E.J. & Braun, H.-P. (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J. Biol. Chem.* **282**, 1–4.

Brandt, U. (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 79–91.

Discursión avanzada sobre modelos de movimiento de protones a través del Complejo I.

Brandt, U. (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I) *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 69–92.

Discusión avanzada de la estructura del Complejo I y las implicaciones para su función.

Brandt, U. & Trumpower, B. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 165–197.

Descripción avanzada de los mecanismos posibles del ciclo Q

Crofts, A.R. & Berry, E.A. (1998) Structure and function of the cytochrome bc_1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 501–509.

Heinemeyer, J., Braun, H.-P., Boekema, E.J., & Kouril, R. (2007) A structural model of the cytochrome *c* reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **282**, 12,240–12,248.

Investigación principal que apoya la existencia de supercomplejos en la mitocondria.

Hosler, J.P., Ferguson-Miller, S., & Mills, D.A. (2006) Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 165–187.

Descripción avanzada de la transferencia electrónica.

Lenaz, G., Fato, R., Genova, M.L., Bergamini, C., Bianchi, C., & Biondi, A. (2006) Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1406–1420.

Revisión de nivel intermedio de la estructura y función del Complejo I.

Lenaz, G. & Genova, M.L. (2007) Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, 1221–1239.

Comprobación de la hipótesis de que existen supercomplejos en la mitocondria.

Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., & Kannt, A. (1998) Cytochrome *c* oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 329–356.

Revisión avanzada de la estructura y función el Complejo IV.

Osyczka, A., Moser, C.C., & Dutton, P.L. (2005) Fixing the Q cycle. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 176–182.

Revisión de nivel intermedio del ciclo Q.

Rottenberg, H. (1998) The generation of proton electrochemical potential gradient by cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 1–16.

Sazanov, L.A. (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* **46**, 2275–2286.

Artículo principal de las investigaciones el Complejo I.

Smith, J.L. (1998) Secret life of cytochrome bc_1. *Science* **281**, 58–59.

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory protein complex II. *Cell* **121**, 1043–1057.

Tielens, A.G.M., Rotte, C., van Hellemond, J.J., & Martin, W. (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 564–572.

Discusión de nivel intermedio de los muchos organismos en los que las mitocondrias no dependen del oxígeno como aceptor final de electrones.

Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., & Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136–1144.

Resolución por cristalografía de rayos X de esta proteína de membrana enorme.

Wikström, M. & Verkhovsky, M.I. (2007) Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 1200–1214.

Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., & Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**, 60–66.

Estructura cristalográfica del Complejo III.

Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Myoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., & Iwata, S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **299**, 700–704.

Revisión avanzada de esta clase de procesos de transferencia de electrones.

Zhang, M., Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (2005) Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 29,403–29,408.

Artículo de investigación importante.

Síntesis de ATP

Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., & Walker, J.E. (1994) The structure of F_1-ATPase from bovine heart mitochondria determined at 2.8 Å resolution. *Nature* **370**, 621–628.

Bianchet, M.A., Hullihen, J., Pedersen, P.L., & Amzel, L.M. (1998) The 2.80 Å structure of rat liver F_1-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis-hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11,065–11,070.

Artículo de investigación que proporciona un detalle estructural importante en apoyo del mecanismo catalítico.

Boyer, P.D. (1997) The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749.

Artículo que describe el desarrollo histórico y estado actual del modelo de cambio debido a la unión, por su principal arquitecto.

Cabezón, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., & Walker, J.E. (2003) The structure of bovine F_1-ATPase in complex with its regulatory protein IF_1. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 744–750.

Hinkle, P.C., Kumar, M.A., Resetar, A., & Harris, D.L. (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **30**, 3576–3582.

Análisis cuidadoso de los resultados experimentales y consideraciones teóricas sobre la cuestión de razones P/O no enteras.

Khan, S. (1997) Rotary chemiosmotic machines. *Biochim. Biophys. Acta* **1322**, 86–105.

Revisión detallada de las estructuras responsables del movimiento rotatorio impulsado por protones de la ATP sintasa y de los flagelos bacterianos.

Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L. (2006) ATP synthesis and the binding change mechanism: the work of Paul D. Boyer. *J. Biol. Chem.* **281**, e18, www.jbc.org.

Artículo clásico del JBC.

Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L. (2006) Unraveling the enzymology of oxidative phosphorylation: the work of Efraim Racker. *J. Biol. Chem.* **281**, e4, www.jbc.org.

Artículo clásico del JBC.

Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M., & Kinosita, K., Jr. (2004) Chemomechanical coupling in F_1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 142–148.

Bella demostración del movimiento rotatorio de la ATP sintasa.

Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., & Futai, M. (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F_oF_1): direct observation. *Science* **286**, 1722–1724.

Prueba experimental de la rotación del cilindro completo de subunidades c en F_oF_1.

Stock, D., Leslie, A.G.W., & Walker, J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700–1705.

Primera visión cristalográfica de la subunidad F_o, en la F_oF_1 de levadura. Véase también el comentario editorial de R. H. Fillingame en el mismo número de *Science*.

Weber, J. & Senior, A.E. (1997) Catalytic mechanism of F_1-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1319**, 19–58.

Revisión avanzada de las pruebas cinéticas, estructurales y bioquímicas del mecanismo de la ATP sintasa.

Regulación de la fosforilación oxidativa

Brand, M.D. & Murphy, M.P. (1987) Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **62**, 141–193.

Descripción avanzada del control respiratorio.

Harris, D.A. & Das, A.M. (1991) Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.* **280**, 561–573.

Discusión avanzada de la regulación de la ATP sintasa por el Ca^{2+} y otros factores.

Klingenberg, M. & Huang, S.-G. (1999) Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**, 271–296.

Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G.J.M., Brandolin, G., & Pebay-Peyroula, E. (2006) Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 713–741.

Revisión avanzada.

Semenza, G.L. (2007) Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. J.* **405**, 1–9.

Revisión de nivel intermedio.

Simon, M.C. (2006) Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* **3**, 150–151.

Revisión corta de nivel intermedio del factor inducible por la hipoxia.

Las mitocondrias en la termogénesis, síntesis de esteroides y apoptosis

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**, 99–163.

Introducción completa sobre el papel del citocromo *c* en la apoptosis.

McCord, J.M. (2002) Superoxide dismutase in aging and disease: an overview. *Methods Enzymol.* **349**, 331–341.

Riedl, S.J. & Salvesen, G.S. (2007) The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 405–413.

Revisión de nivel intermedio.

Genes mitocondriales: su origen y efectos de mutaciones

Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M.K., & Wood, N.W. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 207–219.

Boudina, S. & Abel, E.D. (2006) Mitochondrial uncoupling: a key contributer to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology* **21**, 250–258.

Brandon, M., Baldi, P., & Wallace, D.C. (2006) Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* **25**, 4647–4662.

Chatterjee, A., Mambo, E., & Sidransky, D. (2006) Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* **25**, 4663–4674.

Chen, Z.J. & Butow, R.A. (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 815–825.

Revisión de nivel intermedio.

de Duve, C. (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 395–403.

Revisión de nivel intermedio de las pruebas sobre los orígenes endosimbióticos de las mitocondrias y los cloroplastos.

Freeman, H., Shimomura, K., Horner, E., Cox, R.D., & Ashcroft, F.M. (2006) Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion. *Cell Metab.* **3**, 35–45.

Houstek, J., Pickova, A., Vojtiskova, A., Mracek, T., Pecina, P., & Jesina, P. (2006) Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1400–1405.

Neubauer, S. (2007) The failing heart—an engine out of fuel. *New Engl. J. Med.* **356**, 1140–1151.

Revisión de nivel intermedio de los defectos de la fosforilación oxidativa en la enfermedad cardíaca.

Remedi, M.S., Nichols, C.G., & Koster, J.C. (2006) The mitochondria and insulin release: *Not* just a passing relationship. *Cell Metab.* **3**, 5–7.

Smeitink, J.A., Zeviani, M., Turnbull, D.M., & Jacobs, H.T. (2006) Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab.* **3**, 9–13.

Taylor, R.W. & Turnbull, D.M. (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 389–402.

Revisión de nivel intermedio.

Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial disease in man and mouse. *Science* **283**, 1482–1487.

Wiederkehr, A. & Wollheim, C.B. (2006) Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* **147**, 2643–2649.

Discusión sobre la función mitocondrial en las células β.

FOTOSÍNTESIS

Absorción de la luz

Cogdell, R.J., Isaacs, N.W., Howard, T.D., McLuskey, K., Fraser, N.J., & Prince, S.M. (1999) How photosynthetic bacteria harvest solar energy. *J. Bacteriol.* **181**, 3869–3879.

Revisión corta de nivel intermedio de la estructura y la función del complejo capturador de luz de las bacterias púrpura y el flujo de excitones hacia el centro de reacción.

Green, B.R., Pichersky, E., & Kloppstech, K. (1991) Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 181–186.

Descripción de nivel intermedio de las proteínas que orientan las moléculas de clorofila en los cloroplastos.

Kargul, J., Nield, J., & Barber, J. (2003) Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting Complex I–Photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **278**, 16,135–16,141.

Zuber, H. (1986) Structure of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 414–419.

Flujo electrónico impulsado por la luz

Amunts, A., Drory, O., & Nelson, N. (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* **447**, 58–63.

Determinación cristalográfica de la estructura de PSI.

Barber, J. (2002) Photosystem II: a multisubunit membrane protein that oxidizes water. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 523–530.

Revisión breve de nivel intermedio de la estructura de PSII.

Barber, J. & Anderson, J.M. (eds). (2002) Photosystem II: Molecular Structure and Function. Proceedings of a Meeting, 13–14 March 2002. *Philos. Trans. R. Soc. (Biol. Sci.)* **357** (1426).

Colección de 16 artículos sobre el fotosistema II

Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. (2007) **1767** (6).

Este número de la revista contiene 10 revisiones sobre la estructura y función de los fotosistemas.

Chitnis, P.R. (2001) Photosystem I: function and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 593–626.

Revisión avanzada de gran extensión.

Dau, H. & Haumann, M. (2007) Eight steps preceding O–O bond formation in oxygenic photosynthesis—a basic reaction cycle of the photosystem II manganese complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 472–483.

Uno de los diversos artículos en este número de la revista que tratan de los modelos del mecanismo de escisión del agua.

Deisenhofer, J. & Michel, H. (1991) Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 1–23.

Descripción de la estructura del centro de reacción de las bacterias púrpura y sus implicaciones para la función de los centros de reacción de bacterias y plantas.

Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J., & Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**, 1831–1838.

Fromme, P., Jordan, P., & Krauss, N. (2001) Structure of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 5–31.

Hankamer, B., Barber, J., & Boekema, E.J. (1997) Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 541–571.

Revisión avanzada.

Heathcote, P., Fyfe, P.K., & Jones, M.R. (2002) Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends. Biochem Sci.* **27**, 79–87.

Revisión de nivel intermedio de los fotosistemas I y II.

Huber, R. (1990) A structural basis of light energy and electron transfer in biology. *Eur. J. Biochem.* **187**, 283–305.

Conferencia Nobel por el autor en la que se describe la física y química de las fototransducciones: discusión excepcionalmente clara y bien ilustrada basada en estudios cristalográficos de centros de reacción.

Jensen, P.E., Bassi, R., Boekema, E.J., Dekker, J.P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., & Scheller, H.V. (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 335–352.

Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., & Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å. *Nature* **411**, 909–917.

Kamiya, N. & Shen, J.-R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 98–103.

Kargul, J., Nield, J., & Barber, J. (2003) Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting complex I–photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: insights into light harvesting for PSI. *J. Biol. Chem.* **278**, 16,135–16,141.

Kok, B., Forbush, B., & McGloin, M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution: I. A linear 4-step mechanism. *Photochem. Photobiol.* **11**, 457–475.

Experimentos clásicos que demuestran la necesidad de cuatro fotones para escindir el agua.

Kramer, D.M., Avenson, T.J., & Edwards, G.E. (2007) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends Plant Sci.* **9**, 349–357.

Revisión sobre la regulación de las transiciones de estado.

Vink, M., Zer, H., Alumot, N., Gaathon, A., Niyogi, K., Herrmann, R.G., Andersson, B., & Ohad, I. (2004) Light-modulated exposure of the light-harvesting complex II (LHCII) to protein kinase(s) and state transition in *Chlamydomonas reinhardtii* xanthophyll mutants. *Biochemistry* **43**, 7824–7833.

Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M.J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A., & Yachandra, V.K. (2006) Where water is oxidized to dioxygen: structure of the photosynthetic Mn_4Ca cluster. *Science* **314**, 821–825.

Síntesis de ATP y fotofosforilación

Jagendorf, A.T. (1967) Acid-base transitions and phosphorylation by chloroplasts. *Fed. Proc.* **26**, 1361–1369.

Experimento clásico que establece la capacidad de un gradiente de protones para impulsar la síntesis de ATP en la oscuridad.

Complejo de escisión del agua

Allen, J.F. & Martin, W. (2007) Out of thin air. *Nature* **445**, 610–612.

Discusión breve de nivel intermedio sobre como apareció el moderno esquema en Z.

Luecke, H. (2000) Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 133–156.

Revisión avanzada de una bomba de protones que utiliza una cadena interna de moléculas de agua.

Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., & Lanyi, J.K. (1999) Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution. *Science* **286**, 255–264.

Este artículo y un comentario editorial en el mismo número de *Science* describen el modelo de la translocación de H^+ por el salto de protones.

Poole, A.M. & Penny, D. (2007) Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *BioEssays* **29**, 74–84.

Discusión de nivel intermedio sobre la teoría del origen endosimbiótico.

Stiller, J.W. (2007) Plastid endosymbiosis, genome evolution and the origin of green plants. *Trends Plant Sci.* **12**, 391–396.

Problemas

1. Reacciones de oxidación-reducción El complejo de la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria mitocondrial promueve la siguiente serie de reacciones de oxidación-reducción, en las que Fe^{3+} y Fe^{2+} representan los centros ferrosulfurados, Q es la ubiquinona, QH_2 es el ubiquinol y E es el enzima:

$$(1)\quad NADH + H^+ + E\text{-}FMN \longrightarrow NAD^+ + E\text{-}FMNH_2$$

$$(2)\quad E\text{-}FMNH_2 + 2Fe^{3+} \longrightarrow E\text{-}FMN + 2Fe^{2+} + 2H^+$$

$$(3)\quad 2Fe^{2+} + 2H^+ + Q \longrightarrow 2Fe^{3+} + QH_2$$

$$\textit{Suma}: NADH + H^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2$$

Para cada una de las tres reacciones catalizadas por el complejo de la NADH deshidrogenasa, identifique (a) el dador electrónico, (b) el aceptor electrónico, (c) el par redox conjugado, (d) el agente reductor y (e) el agente oxidante.

2. Todas las partes de la ubiquinona tienen una función En la transferencia electrónica sólo la porción quinona de la ubiquinona experimenta oxidorreducción; la cadena isoprenoide permanece sin cambios. ¿Cuál es la función de esta cadena?

3. Utilización de FAD en lugar de NAD⁺ en la oxidación del succinato Todas las deshidrogenasas que intervienen en la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico utilizan NAD^+ (E'° para $NAD^+/NADH = -0{,}32$ V) como aceptor electrónico, excepto la succinato deshidrogenasa que utiliza FAD unido covalentemente (E'° para $FAD/FADH_2$ en este enzima = 0,050 V). Sugiera por qué el FAD es un receptor electrónico más adecuado que el NAD^+ en la deshidrogenación del succinato basándose en los valores de E'° del par fumarato/succinato ($E'^\circ = 0{,}031$), el par $NAD^+/NADH$ y el par $FAD/FADH_2$ de la succinato deshidrogenasa.

4. Grado de reducción de los transportadores electrónicos en la cadena respiratoria El grado de reducción de cada transportador electrónico de la cadena respiratoria viene determinado por las condiciones existentes en la mitocondria. Por ejemplo, cuando NADH y O_2 son abundantes, el grado de reducción en el estado estacionario de los transportadores disminuye a medida que los electrones pasan desde el sustrato al O_2. Cuando se bloquea la transferencia de electrones, los transportadores anteriores al bloqueo quedan más reducidos mientras que los de detrás quedan más oxidados (véase la Fig. 19–6). Para cada una de las condiciones que se dan a continuación, prediga el estado de oxidación de la ubiquinona y los citocromos b, c_1, c y $a + a_3$.

(a) Suministro abundante de NADH y O_2 pero con adición de cianuro

(b) Suministro abundante de NADH pero O_2 agotado

(c) Suministro abundante de O_2 pero NADH agotado

(d) Suministro abundante de NADH y O_2

5. Efecto de la rotenona y antimicina A sobre la transferencia electrónica La rotenona, producto tóxico natural de algunas plantas, inhibe fuertemente la NADH deshidrogenasa de mitocondrias de insectos y peces. La antimicina A, un antibiótico tóxico, inhibe fuertemente la oxidación del ubiquinol.

(a) Explique por qué la ingestión de rotenona es letal para algunas especies de insectos y de peces.

(b) Explique por qué la antimicina A es un veneno.

(c) Suponiendo que la rotenona y la antimicina A son igualmente efectivas en el bloqueo de sus sitios respectivos en la cadena de transporte electrónico ¿cuál debería ser un veneno más potente? Explíquelo.

6. Desacoplantes de la fosforilación oxidativa En las mitocondrias normales la velocidad de transferencia electrónica está estrechamente acoplada a la demanda de ATP. Cuando la velocidad de utilización de ATP es relativamente baja, la velocidad de transferencia electrónica es baja; cuando aumenta la demanda de ATP, la velocidad de transferencia electrónica aumenta. En estas condiciones de estrecho acoplamiento, el número de moléculas de ATP producidas por átomo de oxígeno consumido cuando el dador electrónico es el NADH (la razón P/O) es próximo a 2,5.

(a) Prediga el efecto de una concentración relativamente baja y de una concentración relativamente alta de un agente desacoplante sobre la velocidad de transferencia electrónica y sobre la razón P/O.

(b) La ingestión de desacoplantes produce gran sudoración y un aumento de la temperatura corporal. Explique este fenómeno en términos moleculares. ¿Qué le sucede a la razón P/O en presencia de desacoplantes?

(c) El desacoplante 2,4-dinitrofenol se recetó antaño como fármaco para perder peso. ¿Cómo puede actuar este agente, en principio, como ayuda para la reducción de peso? Los agentes desacoplantes ya no se recetan porque con su uso se produjeron algunas muertes. ¿Por qué la ingestión de agentes desacoplantes puede causar la muerte?

7. Efectos de la valinomicina sobre la fosforilación oxidativa Cuando se añade el antibiótico valinomicina a mitocondrias en respiración activa, ocurren varias cosas: disminuye la producción de ATP, aumenta la velocidad del consumo de O_2, se libera calor y aumenta el gradiente de pH a través de la membrana interna mitocondrial. ¿Cómo actúa la valinomicina, como un desacoplante o como un inhibidor de la fosforilación oxidativa? Explique las observaciones experimentales en función de la capacidad de transferir iones K^+ a través de la membrana mitocondrial interna.

8. Modo de acción de la diciclohexilcarbodiimida (DCCD) Cuando se añade DCCD a una suspensión de mitocondrias que respiran activamente y están muy acopladas, disminuyen espectacularmente la velocidad de transferencia electrónica (medida según el consumo de O_2) y la velocidad de producción de ATP. Si ahora se añade una solución de 2,4-dinitrofenol a la preparación, el consumo de O_2 vuelve a la normalidad pero la producción de ATP continúa inhibida.

(a) ¿Qué proceso de la transferencia electrónica o de la fosforilación oxidativa es afectado por la DCCD?

(b) ¿Por qué la DCCD afecta el consumo de O_2 por la mitocondria? Explique el efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la preparación mitocondrial inhibida.

(c) ¿A cuál de los siguientes inhibidores se parece más la DCCD en su acción: antimicina A, rotenona u oligomicina?

9. Compartimentalización de los componentes del ciclo del ácido cítrico La isocitrato deshidrogenasa se encuentra únicamente en la mitocondria, pero la malato deshidrogenasa se encuentra tanto en la mitocondria como en el citosol. ¿Cuál es el papel de la malato deshidrogenasa citosólica?

10. Sistema de transporte malato α-cetoglutarato El sistema de transporte que lleva malato y α-cetoglutarato a través de la membrana mitocondrial interna (véase la Fig. 19–29) es inhibido por el n-butilmalonato. Suponga que se añade n-butilmalonato a una suspensión aeróbica de células de riñón que utilizan glucosa exclusivamente como combustible. Prediga el efecto de este inhibidor sobre (a) la glucólisis, (b) el consumo de oxígeno, (c) la formación de lactato y (d) la síntesis de ATP.

11. La concentración de ADP celular controla la síntesis de ATP Aunque tanto el ADP como el P_i son necesarios para la síntesis de ATP, la velocidad de síntesis depende principalmente de la concentración de ADP pero no de la de P_i. ¿Por qué?

12. Escalas de tiempo en los procesos reguladores de la mitocondria Compare las probables escalas de tiempo para los ajustes en la velocidad de respiración causados por (a) aumento en la [ADP] y (b) reducción de pO_2. ¿Qué es lo que explica la diferencia?

13. Efecto Pasteur Cuando se añade O_2 a una suspensión anaeróbica de células que utilizan glucosa a una velocidad elevada, la velocidad de consumo de glucosa desciende de manera espectacular a medida que se consume el O_2 añadido. Además, cesa la producción de lactato. Este efecto, observado primeramente por Louis Pasteur en la década de 1860, es característico de la mayoría de células capaces del catabolismo de la glucosa tanto en forma aeróbica como anaeróbica.

(a) ¿Por qué cesa la acumulación de lactato después de la adición de O_2?

(b) ¿Por qué la presencia de O_2 disminuye la velocidad de consumo de glucosa?

(c) ¿De qué forma el inicio del consumo de O_2 hace que la velocidad de consumo de glucosa sea más lenta? Explíquelo en función de enzimas específicos.

14. Mutantes de levadura deficientes en respiración y producción de etanol Se pueden generar mutantes de levadura deficientes en respiración (p^-; "petites") a partir de progenitores de tipo salvaje mediante tratamiento con agentes mutagénicos. Los mutantes no tienen citocromo oxidasa, un déficit que afecta de manera drástica su comportamiento metabólico. Un efecto sorprendente es que la fermentación no es suprimida por el O_2, es decir, los mutantes no muestran el efecto Pasteur (véase el problema 13). Algunas compañías están muy interesadas en utilizar estos mutantes en la fermentación de astillas de madera para producir etanol como combustible. Explique las ventajas del uso de estos mutantes en lugar de la cepa de levadura salvaje en las producciones de etanol a gran escala. ¿Por qué la falta de citocromo oxidasa anula el efecto Pasteur?

15. Ventajas de los supercomplejos en la transferencia electrónica Hay cada vez más pruebas de que los Complejos I, II, III y IV mitocondriales forman parte de un supercomplejo más grande. ¿Cuál podría ser la ventaja de tener los cuatro complejos dentro de un supercomplejo?

16. ¿Cuántos protones hay en una mitocondria? La transferencia de electrones funciona translocando protones desde la matriz mitocondrial al medio exterior, estableciendo un gradiente de pH a través de la membrana interna (el exterior más ácido que el interior). La tendencia de los protones a difundir de nuevo desde el exterior a la matriz es la fuerza motriz para la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Durante la fosforilación oxidativa por una suspensión de mitocondrias en un medio de pH 7,4, el pH interno de la matriz era 7,7.

(a) Calcule la $[H^+]$ en el medio externo y en la matriz en estas condiciones.

(b) ¿Cuál es la razón exterior:interior en la $[H^+]$? Comente sobre la energía inherente en esta diferencia de concentración. (Pista: Vea la Ec. 11–4, p. 396.)

(c) Calcule el número de protones en una mitocondria hepática en respiración suponiendo que el compartimiento de la matriz interna es una esfera de 1,5 μm de diámetro.

(d) A partir de estos datos ¿considera que el gradiente de pH por sí solo es suficientemente grande para generar ATP?

(e) En caso contrario, ¿puede indicar de qué modo puede surgir la energía necesaria para la síntesis de ATP?

17. Velocidad de recambio del ATP en el músculo de corazón de rata El músculo de corazón de rata que opera aeróbicamente cubre más del 90% de sus necesidades de ATP por fosforilación oxidativa. Cada gramo de tejido consume O_2 a la velocidad de 10,0 μmol/min cuando el combustible es la glucosa.

(a) Calcule la velocidad a la que el músculo de corazón consume glucosa y produce ATP.

(b) Si la concentración en el estado estacionario de ATP en el músculo cardíaco de rata es 5,0 μmol/g de tejido, calcule el tiempo requerido (en segundos) para el recambio completo del fondo celular de ATP. ¿Qué es lo que indica este resultado acerca de la necesidad de una estrecha regulación de la producción de ATP? (Nota: Las concentraciones se expresan en micromoles por gramo de tejido muscular, ya que la mayor parte del tejido es agua).

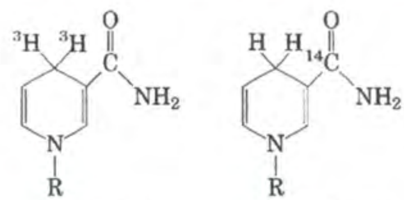
18. Velocidad de degradación del ATP en el músculo volador de insecto La producción de ATP en los músculos voladores de la mosca *Lucilia sericata* es casi exclusivamente el resultado de la fosforilación oxidativa. Durante el vuelo, se necesitan 187 mL de O_2/h·g de peso corporal para mantener una concentración de ATP de 7,0 μmol/g de músculo volador. Suponiendo que los músculos voladores representan el 20% del peso de la mosca, calcule la velocidad a la que se recambia el ATP del músculo volador. En ausencia de fosforilación oxidativa, ¿cuánto tiempo duraría la reserva de ATP? Suponga que los equivalentes de reducción se transfieren desde la lanzadora del glicerol 3-fosfato y que el O_2 está a 25 °C y 101,3 kPa (1 atm).

19. Enfermedad mitocondrial y cáncer Mutaciones en los genes que codifican ciertas proteínas mitocondriales están asociadas a una elevada incidencia de algunos tipos de cáncer. ¿De qué modo podrían las mitocondrias defectuosas provocar cáncer?

20. Gravedad variable de una enfermedad mitocondrial Los individuos afectados por una enfermedad causada por un defecto específico del genoma mitocondrial pueden tener síntomas que van de leve a grave. Explique el motivo.

21. Movimiento transmembrana de equivalentes de reducción En condiciones aeróbicas, el NADH extramitocondrial se ha de oxidar a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Considere una preparación de hepatocitos de rata que contienen mitocondrias así como todos los enzimas del citosol. Si se introduce [4-^{3}H]NADH, aparece rápidamente radiactividad en la matriz mitocondrial. Sin embargo, si se introduce

[7-^{14}C]NADH no aparece radiactividad en la matriz. ¿Qué nos dicen estas observaciones acerca de la oxidación de NADH extramitocondrial por la cadena de transporte electrónico?



[4-^{3}H]NADH [7-^{14}C]NADH

22. Elevada concentración de alanina en sangre asociada a defectos de la fosforilación oxidativa Se ha encontrado que la mayoría de individuos con defectos genéticos en la fosforilación oxidativa tienen concentraciones relativamente elevadas de alanina en su sangre. Explique esto en términos bioquímicos.

23. Reservas de NAD y actividades deshidrogenasa Aunque tanto la piruvato deshidrogenasa como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa utilizan NAD^+ como aceptor de electrones, los dos enzimas no compiten por la misma reserva de NAD celular. ¿Por qué?

24. Diabetes como consecuencia de defectos mitocondriales La glucoquinasa es esencial para el metabolismo de la glucosa en las células β pancreáticas. Los humanos con dos copias defectuosas del gen de la glucoquinasa muestran una diabetes neonatal grave, mientras que los que sólo tienen una copia defectuosa del gen tienen una forma de enfermedad mucho más leve (diabetes de los jóvenes de aparición madura, MODY2). Explique esta diferencia en función de la biología de la célula β.

25. Efectos de mutaciones en el Complejo II mitocondrial Cambios en un único nucleótido del gen de la succinato deshidrogenasa (Complejo II) se asocian con tumores cancerígenos del intestino medio. Sugiera un mecanismo que explique esta observación.

26. Eficiencia fotoquímica de luz de diferentes longitudes de onda La velocidad de fotosíntesis, medida según la producción de O_2, es mayor cuando una planta verde se ilumina con luz de 680 nm de longitud de onda que con luz de 700 nm. No obstante, la iluminación mediante una combinación de luz de 680 y 700 nm da una velocidad de fotosíntesis mayor que la de cualquiera de las dos longitudes de onda separadamente. Explíquelo.

27. Balance de la fotosíntesis En 1804 Theodore de Saussure observó que el peso total del oxígeno y de la materia orgánica seca producida por las plantas es mayor que el peso del dióxido de carbono consumido durante la fotosíntesis. ¿De dónde proviene el peso extra?

28. Papel del H_2S en algunas bacterias fotosintéticas Bacterias sulfuradas púrpura iluminadas realizan la fotosíntesis en presencia de H_2O y $^{14}CO_2$ pero sólo cuando se añade H_2S y en ausencia de O_2. Durante el transcurso de la fotosíntesis, medido por la formación de [^{14}C]glúcido, el H_2S se convierte en azufre elemental, pero no se desprende O_2. ¿Cuál es el papel de la conversión del H_2S en azufre? ¿Por qué no se desprende O_2?

29. Aumento del poder reductor del fotosistema I por la absorción de la luz Cuando el fotosistema I absorbe luz roja a 700 nm, el potencial de reducción estándar del P700 cambia desde 0,40 V a alrededor de –1,2 V. ¿Qué proporción de la luz absorbida es retenida en forma de poder reductor?

30. Flujo electrónico a través de los fotosistemas I y II Prediga de qué modo un inhibidor del paso de electrones a través de la feofitina afectaría el flujo electrónico a través de (a) el fotosistema II y (b) el fotosistema I. Explíquelo.

31. Síntesis limitada de ATP en la oscuridad En un experimento de laboratorio se iluminan cloroplastos de espinaca en ausencia de ADP y P_i, a continuación se apaga la luz y se añaden ADP y P_i. Se sintetiza ATP en la oscuridad por un corto período de tiempo. Explique este descubrimiento.

32. Modo de acción del herbicida DCMU Cuando se tratan cloroplastos con el potente herbicida 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU o diuron), cesan el desprendimiento de O_2 y la fotofosforilación. Se puede restaurar el desprendimiento de O_2, pero no la fotofosforilación, por adición de un aceptor electrónico externo o reactivo de Hill. ¿De qué modo actúa el DCMU como herbicida? Sugiera una localización para el sitio de inhibición de este herbicida en el esquema que se muestra en la Fig. 19–56. Explíquelo.

33. Efecto de la venturicidina sobre el desprendimiento de oxígeno La venturicidina es un potente inhibidor de la ATP sintasa de los cloroplastos, interaccionando con la parte CF_o del enzima y bloqueando el paso de protones a través del complejo CF_oCF_1. ¿De qué modo se vería afectado por la venturicidina el desprendimiento de oxígeno en una suspensión de cloroplastos bien iluminados? ¿Cambiaría su respuesta si el experimento se realizase en presencia de un agente desacoplante tal como el 2,4-dinitrofenol (DNP)? Explíquelo.

34. Bioenergética de la fotofosforilación Las concentraciones de estado estacionario de ATP, ADP y P_i en los cloroplastos de espinaca aislados bajo iluminación completa a pH 7,0 son 120,0, 6,0 y 700,0 μM, respectivamente.

(a) ¿Cuáles son los requerimientos de energía libre para la síntesis de 1 mol de ATP en estas condiciones?

(b) La energía para la síntesis de ATP es proporcionada por la transferencia de electrones inducida por la luz en los cloroplastos. ¿Cuál es el descenso de voltaje mínimo (durante la transferencia de un par de electrones) para sintetizar ATP en estas condiciones? (Puede que necesite consultar la Ec. 13–7, p. 515.)

35. Energía luminosa para una reacción redox Imagine que ha aislado un microorganismo fotosintético nuevo que oxida H_2S y transfiere los electrones al NAD^+. ¿Qué longitud de onda proporcionaría suficiente energía para que el H_2S redujera el NAD^+ en condiciones estándar? Suponga un 100% de eficiencia en el proceso fotoquímico y utilice E'° = –243 mV para el H_2S y –320 mV para el NAD^+. Véase la Fig. 19–46 para los equivalentes energéticos de las longitudes de onda de la luz.

36. Constante de equilibrio de las reacciones que escinden el agua El coenzima $NADP^+$ es el aceptor electrónico terminal en los cloroplastos según la reacción

$$2H_2O + 2NADP^+ \longrightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Utilice la información de la Tabla 19–2 para calcular la constante de equilibrio a 25 °C de esta reacción. (La relación entre K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$ se discute en la p. 492). ¿De qué modo puede superar el cloroplasto este equilibrio desfavorable?

37. Energética de la fototransducción Durante la fotosíntesis se han de absorber ocho fotones de luz (cuatro por cada fotosistema) por cada molécula de O_2 producida:

$$2H_2O + 2NADP^+ + 8 \text{ fotones} \longrightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Suponiendo que estos fotones tengan una longitud de onda de 700 nm (rojo) y que la absorción y uso de la energía luminosa sea del 100%, calcule la variación de energía libre del proceso.

38. Transferencia de electrones a un reactivo de Hill Los cloroplastos de espinaca aislados desprenden O_2 cuando se iluminan en presencia de ferricianuro potásico (un reactivo de Hill), según la ecuación

$$2H_2O + 4Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + 4H^+ + 4Fe^{2+}$$

en donde Fe^{3+} representa el ferricianuro y Fe^{2+}, el ferrocianuro. ¿Se produce NADPH en este proceso? Explíquelo.

39. ¿Con qué frecuencia absorbe un fotón una molécula de clorofila? La cantidad de clorofila *a* (M_r 892) en una hoja de espinaca es de aproximadamente 20 $\mu g/cm^2$ de hoja. A la luz del mediodía (energía media de 5,4 $J/cm^2 \cdot min$), la hoja absorbe alrededor del 50% de la radiación. ¿Con qué frecuencia una molécula individual de clorofila absorbe un fotón? Si la vida media de una molécula de clorofila excitada in vivo es 1 ns, ¿qué parte de las moléculas de clorofila están excitadas en un momento determinado?

40. Efecto de la luz monocromática sobre el flujo de electrones El grado en el que un transportador electrónico está oxidado o reducido durante la transferencia de electrones fotosintética puede observarse a veces directamente con un espectrofotómetro. Cuando se iluminan cloroplastos con luz de 700 nm, el citocromo *f*, la plastocianina y la plastoquinona están oxidados. No obstante, cuando se iluminan los cloroplastos con luz de 680 nm estos transportadores electrónicos están reducidos. Explíquelo.

41. Función de la fotofosforilación cíclica Cuando la razón $[NADPH]/[NADP^+]$ en los cloroplastos es elevada, la fotofosforilación es predominantemente cíclica (Fig. 19–56). ¿Se desprende O_2 durante la fotofosforilación cíclica? ¿Se produce NADPH? Explíquelo. ¿Cuál es la función principal de la fotofosforilación?

Problema de análisis de datos

42. Fotofosforilación: descubrimiento, rechazo y redescubrimiento En las décadas de 1930 y 1940 se empezaron a hacer progresos respecto a la comprensión del mecanismo de fotosíntesis. En aquella época, empezaba justamente a conocerse el papel de los "enlaces fosfato ricos en energía" (hoy en día, "ATP") en la glucólisis y en la respiración celular. Habían muchas teorías sobre el mecanismo de la fotosíntesis, especialmente sobre el papel de la luz. Este problema se centraba en lo que entonces se denominaba "proceso fotoquímico primario", es decir, sobre qué es, exactamente, lo que produce la energía de la luz capturada en la célula fotosintética. Curiosamente, una parte importante del modelo moderno de fotosíntesis fue propuesta muy tempranamente, para ser rechazada, ignorada durante varios años y finalmente recuperada y aceptada.

En 1944, Emerson, Stauffer y Umbreit propusieron que "la función de la energía luminosa en la fotosíntesis es la formación de enlaces fosfato de alta energía"' (p. 107). En su modelo (de aquí en adelante, el "modelo de Emerson"), la energía libre necesaria para impulsar la fijación *y* reducción del CO_2 procedía de estos "enlaces fosfato ricos en energía" (es decir, ATP) producidos como resultado de la absorción de la luz por una proteína que contenía clorofila.

Este modelo fue rechazado explícitamente por parte de Rabinowitch (1945). Después de resumir los hallazgos de Emerson y colaboradores Rabinowitch declaró: "Hasta que no se proporcionen pruebas más sólidas, nos inclinamos a considerar como más convincente un argumento general contra esta hipótesis, que puede deducirse a partir de consideraciones energéticas. La fotosíntesis es eminentemente un problema de *acumulación* de energía. ¿Qué beneficio puede tener, entonces, convertir quanta de luz (incluso los de la luz roja que pueden significar unas 43 kcal por Einstein) en "quanta de fosfato" de sólo 10 kcal por mol? Este hecho parece ser un camino en la dirección errónea, hacia la *disipación* y no hacia la acumulación de energía" (Vol. I, p. 228). Este argumento, junto con otras pruebas, llevaron al abandono del modelo de Emerson hasta la década de 1950, cuando se descubrió que era correcto, si bien en una forma algo modificada.

Para cada una de las informaciones del artículo de Emerson y colaboradores, presentadas más adelante desde (a) a (d), responda las siguientes preguntas:

1. ¿De qué modo esta información apoya el modelo de Emerson en el que la energía luminosa se utiliza directamente por la clorofila *para formar ATP*, el cual proporciona seguidamente la energía para impulsar la fijación y reducción del CO_2?

2. ¿Cómo explicaría Rabinowitch esta información, basándose en su modelo (y la mayoría de los restantes modelos de la época), en el que la energía luminosa se utiliza directamente por la clorofila para *sintetizar compuestos reducidos*? Rabinowitch escribió: "Teóricamente, no existe razón por la que *toda* la energía de los electrones contenida en las moléculas excitadas por la absorción de la luz no debiera estar disponible para oxidación-reducción" (Vol I, p. 152). En este modelo, los compuestos reductores se utilizan para fijar y reducir el CO_2, y la energía para estas reacciones viene de las grandes cantidades de energía libre cedida por las reacciones de reducción.

3. ¿Cómo se explica esta información con nuestros conocimientos modernos sobre la fotosíntesis?

(a) La clorofila contiene un ión Mg^{2+}, que se sabe que es un cofactor esencial para muchos enzimas que catalizan reacciones de fosforilación y desfosforilación.

(b) Una "proteína de clorofila" cruda aislada de células fotosintéticas mostró actividad fosforilante.

(c) La actividad fosforilante de la "proteína de clorofila" era inhibida por la luz.

(d) Los niveles de varios compuestos fosforilados diferentes de las células fotosintéticas cambiaron de manera espectacular en respuesta a la exposición a la luz (Emerson y colaboradores no pudieron identificar los compuestos específicos implicados).

Finalmente, se vio que tanto el modelo de Emerson como el de Rabinowitch eran parcialmente correctos y parcialmente incorrectos.

(e) Explique cuál de los dos modelos está más en concordancia con nuestro modelo actual de la fotosíntesis.

En su rechazo del modelo de Emerson, Rabinowitch continuó: "La dificultad de la teoría del almacenamiento de fosfato aparece de manera más clara cuando uno considera el hecho de que, con luz tenue, ocho o diez quanta de luz son suficientes para reducir una molécula de dióxido de carbono. Si cada quanto produjese una molécula de fosfato de alta energía, la energía acumulada sería de sólo 80–100 kcal por Einstein, mientras que la fotosíntesis requiere *al menos* 112 kcal por mol, y probablemente más, debido a pérdidas en las reacciones parciales irreversibles" (Vol. I, p. 228)

(f) ¿De qué modo el valor de Rabinowitch de 8 a 10 fotones por molécula de CO_2 se corresponde con el valor aceptado actualmente? Necesitará consultar el Capítulo 20 para parte de la información aquí requerida.

(g) ¿Cómo refutaría el argumento de Rabinowitch, basándose en nuestro conocimiento actual de la fotosíntesis?

Referencias

Emerson, R.L., Stauffer, J.F., & Umbreit, W.W. (1944) Relationships between phosphorylation and photosynthesis in *Chlorella*. *Am. J. Botany* **31**, 107–120.

Rabinowitch, E.I. (1945) *Photosynthesis and Related Processes*, Interscience Publishers, New York.

> . . . el descubrimiento del isótopo de carbono de vida larga, carbono-14, por Samuel Ruben y Martin Kamen en 1940, proporcionó la herramienta ideal para seguir la ruta a lo largo de la cual viaja el dióxido de carbono para incorporarse en los glúcidos.
>
> —*Melvin Calvin, Conferencia Nobel, 1961*

20

Biosíntesis de glúcidos en plantas y bacterias

Hemos llegado a un punto de inflexión en el estudio del metabolismo celular. Hasta ahora en la Parte II se ha descrito la forma en que los principales combustibles metabólicos (glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos) se degradaban vía rutas *catabólicas* convergentes para entrar en el ciclo del ácido cítrico y ceder sus electrones a la cadena respiratoria y cómo este flujo exergónico de electrones hasta el oxígeno está acoplado a la síntesis endergónica de ATP. Ahora pasamos a las rutas *anabólicas* que utilizan la energía química en forma de ATP y NADH o NADPH para sintetizar componentes celulares a partir de moléculas precursoras sencillas. En general las rutas anabólicas son reductoras en lugar de oxidativas. El catabolismo y el anabolismo transcurren simultáneamente en un estado estacionario dinámico, de modo que la degradación de componentes celulares que producen energía se equilibra con los procesos biosintéticos que crean y mantienen la intrincada ordenación de las células vivas.

Las plantas han de ser especialmente versátiles en la manipulación de los glúcidos por diversos motivos. En primer lugar, las plantas son autótrofos, capaces de convertir carbono inorgánico (en forma de CO_2) en compuestos orgánicos. Segundo, la biosíntesis tiene lugar principalmente en plastidios, orgánulos limitados por membrana únicos de los organismos fotosintéticos, siendo el movimiento de intermediarios entre compartimientos celulares un aspecto importante del metabolismo. Tercero, las plantas no se desplazan: no pueden moverse para encontrar mejores fuentes de agua, luz solar o nutrientes. Han de tener suficiente flexibilidad metabólica para poder adaptarse a condiciones cambiantes en el lugar en que están arraigadas. Finalmente, las plantas tienen paredes celulares gruesas formadas por polímeros glucídicos que deben formarse fuera de la membrana plasmática y que constituyen una parte importante del glúcido celular.

El capítulo empieza con una descripción de los procesos por los que el CO_2 se asimila en forma de triosas y hexosas, y a continuación se considera la fotorrespiración, una importante reacción secundaria durante la fijación de CO_2 y la forma en que ciertas plantas evitan esta reacción secundaria. Posteriormente se discute de qué modo se consigue la biosíntesis de sacarosa (azúcar de transporte) y el almidón (para el almacenamiento de energía) mediante mecanismos análogos a los empleados por las células animales para fabricar glucógeno. El tema siguiente es la síntesis de la celulosa de las paredes celulares de las plantas y el peptidoglucano de las paredes celulares bacterianas, donde se ponen de manifiesto los problemas de la biosíntesis dependiente de energía fuera de la membrana plasmática. Finalmente se discute la forma por la que las diversas rutas que comparten reservas de intermediarios comunes se segregan dentro de orgánulos, si bien al mismo tiempo están integradas entre sí.

20.1 Síntesis fotosintética de glúcidos

La síntesis de glúcidos en las células animales utiliza siempre precursores que tienen, al menos, tres carbonos, todos ellos a un nivel de oxidación inferior al del carbono del CO_2. En cambio, las plantas y los microorganismos fotosintéticos pueden formar glúcidos a partir de CO_2 y agua, reduciendo el CO_2 a expensas de la energía y el poder reductor suministrados por el ATP y el NADPH generados en las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis **(Fig. 20–1)**. Las plantas (y otros autótrofos) pueden utilizar CO_2 como fuente única de todos los átomos de carbono requeridos para la biosíntesis de celulosa y almidón, lípidos y proteínas, y demás compuestos orgánicos de las células vegetales. En cambio, los organismos heterótrofos son incapaces de llevar a término la reducción neta del CO_2 para conseguir una síntesis neta de glucosa.

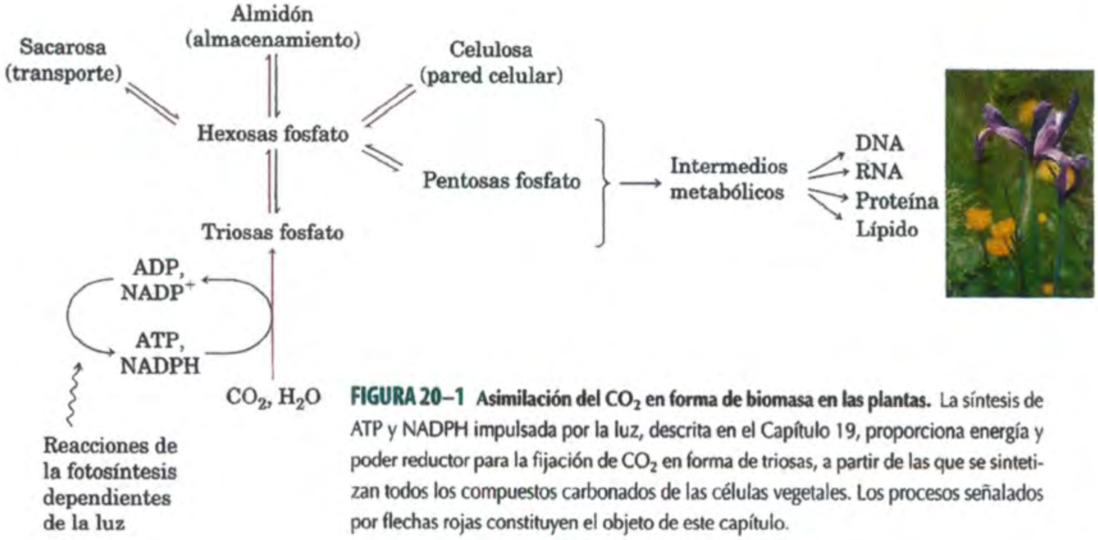


FIGURA 20–1 Asimilación del CO_2 en forma de biomasa en las plantas. La síntesis de ATP y NADPH impulsada por la luz, descrita en el Capítulo 19, proporciona energía y poder reductor para la fijación de CO_2 en forma de triosas, a partir de las que se sintetizan todos los compuestos carbonados de las células vegetales. Los procesos señalados por flechas rojas constituyen el objeto de este capítulo.

Las plantas verdes contienen en sus cloroplastos una maquinaria enzimática sin par que cataliza la conversión del CO_2 en compuestos orgánicos sencillos (reducidos), proceso que se denomina **asimilación de CO_2.** Este proceso se ha llamado también **fijación de CO_2** o **fijación de carbono,** aunque aquí reservaremos estos términos para la reacción específica en la que el CO_2 es incorporado (fijado) en un compuesto orgánico de tres carbonos, la triosa fosfato 3-fosfoglicerato. Este producto sencillo de la fotosíntesis es el precursor de biomoléculas más complejas, entre ellas glúcidos, polisacáridos y metabolitos derivados de los mismos, todos los cuales se sintetizan a través de rutas metabólicas similares a las de los tejidos animales. El dióxido de carbono se asimila en una ruta cíclica en la que se regeneran constantemente intermediarios clave. La ruta fue descubierta a principios de la década de 1950 por Melvin Calvin, Andrew Benson y James A. Bassham, y a menudo se llama **ciclo de Calvin** o, más descriptivamente, **ciclo de reducción fotosintética del carbono.**

Melvin Calvin, 1911–1997

El metabolismo de los glúcidos es más complejo en las células vegetales que en las animales o en los microorganismos no fotosintéticos. Además de las rutas universales de la glucólisis y la gluconeogénesis, las plantas tienen la secuencia de reacciones específica para la reducción del CO_2 a triosas fosfato y la ruta reductora asociada de las pentosas fosfato, todas las cuales han de estar reguladas de forma coordinada para asegurar la asignación adecuada de carbono a la producción de energía y a la síntesis de almidón y sacarosa. Tal como veremos, los enzimas clave están regulados por (1) reducción de enlaces disulfuro por electrones que fluyen desde el fotosistema I y (2) cambios en el pH y concentración de Mg^{2+} resultantes de la iluminación. Cuando observamos otros aspectos del metabolismo de glúcidos en plantas, también encontramos enzimas que son modulados por (3) regulación alostérica convencional por uno o más intermediarios metabólicos y (4) modificación covalente (fosforilación).

Los plastidios son orgánulos propios de las células vegetales y de las algas

La mayoría de las actividades biosintéticas de las plantas (incluida la asimilación de CO_2) tiene lugar en los **plastidios,** una familia de orgánulos autorreproductivos limitados por una doble membrana y que contienen un pequeño genoma que codifica algunas de sus proteínas. La mayor parte de las proteínas destinadas a plastidios están codificadas en genes nucleares que se transcriben y traducen de la misma manera que otros genes nucleares; las proteínas son a continuación importadas a los plastidios. Éstos se reproducen por fisión binaria, replicando su genoma (una sola molécula de DNA circular) y utilizando sus propios enzimas y ribosomas para sintetizar las proteínas codificadas por dicho genoma. Los **cloroplastos** (véase la Fig. 19–45) son los sitios de asimilación de CO_2. Los enzimas para este proceso están contenidos en el estroma, la fase soluble limitada por la membrana interna del cloroplasto. Los **amiloplastos** son plastidios incoloros (es decir, carecen de clorofila y otros pigmentos que se encuentran en los cloroplastos). No tienen membranas internas análogas a las membranas fotosintéticas (tilacoides) de los cloroplastos, y en los tejidos ricos en almidón estos plastidios están rellenos de gránulos de almidón **(Fig. 20–2)**.

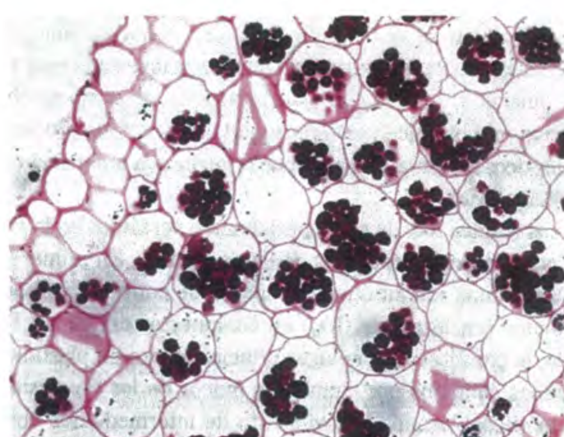


FIGURA 20–2 Amiloplastos rellenos de almidón (gránulos oscuros) teñidos con yodo en este corte de células de la raíz de *Ranunculus*. Los gránulos de almidón de los diversos tejidos van desde 1 a 100 μm de diámetro.

Los cloroplastos pueden convertirse en **proplastidios** por pérdida de sus membranas internas y clorofila, y los proplastidios son interconvertibles con los amiloplastos (**Fig. 20–3**). A su vez, tanto los amiloplastos como los proplastidios pueden transformarse en cloroplastos. Las proporciones relativas de los tipos de plastidios dependen del tipo de tejido vegetal y de la intensidad de la iluminación. Las células de las hojas verdes son ricas en cloroplastos, mientras que los amiloplastos dominan en tejidos no fotosintéticos que almacenan almidón en grandes cantidades, tales como los tubérculos de patata.

Las membranas internas de todos los tipos de plastidios son impermeables a las moléculas polares y a las cargadas. El tráfico a través de estas membranas está facilitado por conjuntos de transportadores específicos.

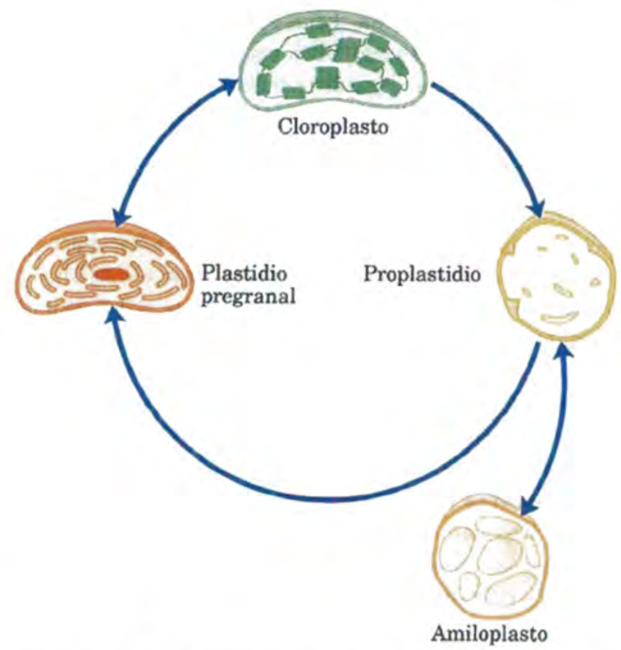


FIGURA 20–3 Plastidios: origen e interconversiones. Todos los tipos de plastidios están limitados por una doble membrana y algunos (especialmente los cloroplastos maduros) tienen membranas internas extensas. Las membranas internas pueden perderse (cuando un cloroplasto maduro se transforma en un proplastidio) y resintetizarse (como cuando un proplastidio da lugar a un plastidio pregranal y a continuación a un cloroplasto maduro). Los proplastidios de tejidos no fotosintéticos (tales como los de la raíz) forman amiloplastos que contienen grandes cantidades de almidón. Todas las células vegetales tienen plastidios, siendo estos orgánulos el sitio de otros procesos importantes entre los que se cuentan la síntesis de aminoácidos esenciales, tiamina, piridoxal fosfato, flavinas y vitaminas A, C, E y K.

La asimilación del dióxido de carbono tiene lugar en tres fases

La primera fase en la asimilación del CO_2 en las biomoléculas (**Fig. 20–4**) es la **reacción de fijación del carbono:** condensación del CO_2 con un aceptor de cinco carbonos, la **ribulosa 1,5-bisfosfato,** formando dos moléculas de **3-fosfoglicerato.** En la segunda fase el 3-fosfoglicerato se reduce a triosas fosfato. En conjunto, se fijan tres moléculas de CO_2 a tres moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato para formar seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (18 carbonos) en equilibrio con la dihidroxiacetona fosfato. En la tercera fase se utilizan cinco de las seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (15 carbonos) en la regeneración de tres moléculas del material inicial ribulosa 1,5-bisfosfato. Las sexta molécula de triosa fosfato, el producto neto de la fotosíntesis, puede ser utilizada para formar hexosas que sirven como combustible y como material para producir sacarosa para el transporte a tejidos no fotosintéticos o almidón para almacenamiento. De este modo el proceso es cíclico y permite la conversión continua de CO_2 en triosas y hexosas fosfato. La fructosa 6-fosfato es un intermediario clave en la fase 3 de la asimilación del CO_2; es un punto de bifurcación, que dirige hacia la regeneración de ribulosa 1,5-bisfosfato o hacia la síntesis de almidón. En la ruta desde hexosa fosfato a pentosa bisfosfato intervienen muchas de las reacciones utilizadas en células animales para la conversión de pentosas fosfato en hexosas fosfato durante la fase no oxidativa de la **ruta de las pentosas fosfato** (véase la Fig. 14-22). En la asimilación fotosintética del CO_2, esta ruta funciona en la dirección opuesta, utilizando básicamente el mismo conjunto de reacciones y convirtiendo hexosas fosfato en pentosas fosfato. Este **ciclo reductor de las pentosas fosfato** utiliza los mismos enzimas que la ruta oxidativa y algunos más que hacen que el ciclo reductor sea irreversible. Los 13 enzimas de la ruta se encuentran en el estroma del cloroplasto.

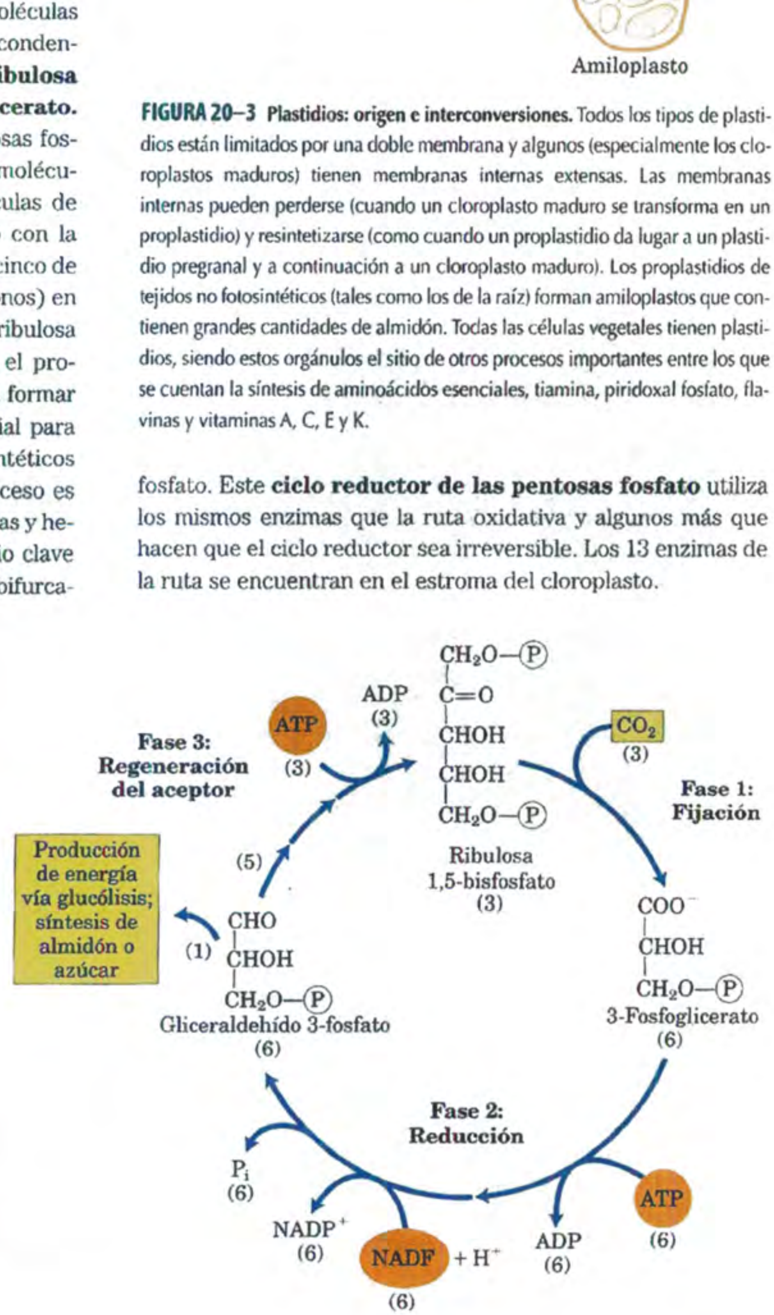


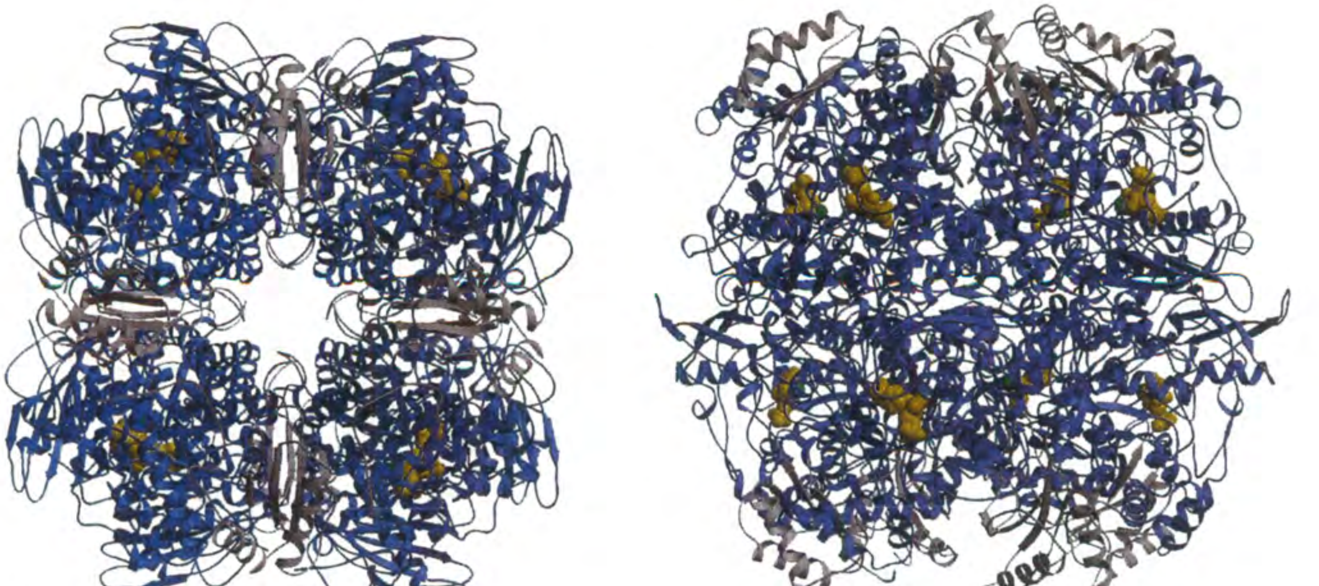
FIGURA 20–4 Las tres fases de la asimilación del CO_2 en los organismos fotosintéticos. Las estequiometrías de tres intermediarios clave (números en paréntesis) revelan el destino de los átomos de carbono que entran y abandonan el ciclo. Tal como se muestra aquí, se fijan tres CO_2 para la síntesis neta de una molécula de gliceraldehído 3-fosfato. Este ciclo es el ciclo de la reducción fotosintética del carbono o ciclo de Calvin.

Fase 1: Fijación del CO_2 en 3-fosfoglicerato A finales de la década de 1940 se descubrió una pista importante sobre la naturaleza de los mecanismos de asimilación del CO_2 en los organismos fotosintéticos cuando Calvin y colaboradores iluminaron una suspensión de algas verdes en presencia de dióxido de carbono radiactivo ($^{14}CO_2$) durante unos pocos segundos. Rápidamente mataron las células, extrajeron su contenido y con la ayuda de métodos cromatográficos buscaron los metabolitos en los que aparecía primeramente el carbono marcado. El primer compuesto que se marcaba era el **3-fosfoglicerato,** con el ^{14}C localizado de manera predominante en el átomo de carbono carboxílico. Estos experimentos sugerían fuertemente que el 3-fosfoglicerato es un intermediario temprano en la fotosíntesis. El gran número de plantas en las que este compuesto de tres carbonos es el primer intermediario se denominan **plantas C_3,** en contraposición con las plantas C_4 que se describen más adelante.

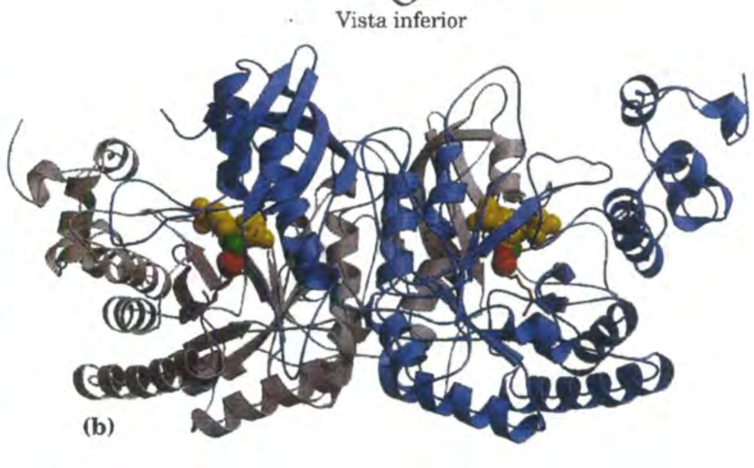
El enzima que cataliza la incorporación del CO_2 en una forma orgánica es la **ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa** (a menudo llamada abreviadamente **rubisco**). En tanto que carboxilasa, la rubisco cataliza la unión covalente del CO_2 al azúcar de cinco carbonos ribulosa 1,5-bisfosfato y la rotura del intermedio inestable de seis carbonos formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato, una de las cuales es portadora del nuevo carbono introducido en forma de CO_2 en su grupo carboxilo (Fig. 20–4). La actividad oxigenasa del enzima se discute en la Sección 20.2.

Existen dos clases diferentes de rubisco. La forma I se encuentra en las plantas vasculares, algas y cianobacterias; la forma II está confinada a ciertas bacterias fotosintéticas. La rubisco vegetal, enzima clave en la producción de biomasa a partir del CO_2, tiene una estructura compleja de forma I **(Fig. 20–5a)**, con ocho subunidades grandes idénticas (M_r 53.000; está codificada en el genoma del cloroplasto o plastoma) con un sitio catalítico en cada una de ellas y ocho subunidades pequeñas idénticas (M_r 14.000; codificadas en el genoma nuclear) cuya función no es bien conocida. La rubisco de la forma II de las bacterias fotosintéticas es de estructura más sencilla, con dos subunidades que se parecen en muchos aspectos a las subunidades grandes del enzima vegetal (Fig. 20–5b). Esta similitud es consistente con la hipótesis endosimbiótica sobre el origen de los cloroplastos (p. 33). El enzima de plantas tiene un número de recambio excepcionalmente bajo; sólo se fijan tres moléculas de CO_2 por segundo por molécula de rubisco a 25 °C. Para conseguir velocidades elevadas de fijación de CO_2 las plantas necesitan grandes cantidades de este enzima. De hecho, la rubisco constituye alrededor del 50% de la proteína soluble del cloroplasto y es quizás uno de los enzimas más abundantes de la biosfera.

En el mecanismo propuesto para la rubisco de plantas tiene un papel central una cadena lateral de Lys carbamilada con



(a) Vista superior Vista inferior



(b)

FIGURA 20–5 Estructura de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (rubisco). (a) Vista superior y vista lateral de un modelo de cintas de la rubisco de la forma I de espinaca (PDB ID 8RUC). El enzima tiene ocho subunidades grandes (azul) y ocho subunidades pequeñas (gris), fuertemente empaquetadas en una estructura de M_r 550.000. La rubisco se encuentra presente a una concentración de unos 250 mg/mL en el estroma del cloroplasto, lo que corresponde a una concentración extraordinariamente elevada de sitios activos (~4 mM). Los residuos aminoácidos del sitio activo se muestran en amarillo y el Mg^{2+} en verde. **(b)** Modelo de cintas de la rubisco de la forma II de la bacteria *Rhodospirillum rubrum* (PDB ID 9RUB). Las subunidades se muestran en gris y azul. En rojo se muestra un residuo Lys del sitio activo que está carboxilado formando un carbamato en el enzima activo. El sustrato, ribulosa 1,5-bisfosfato está en amarillo y el Mg^{2+} en verde.

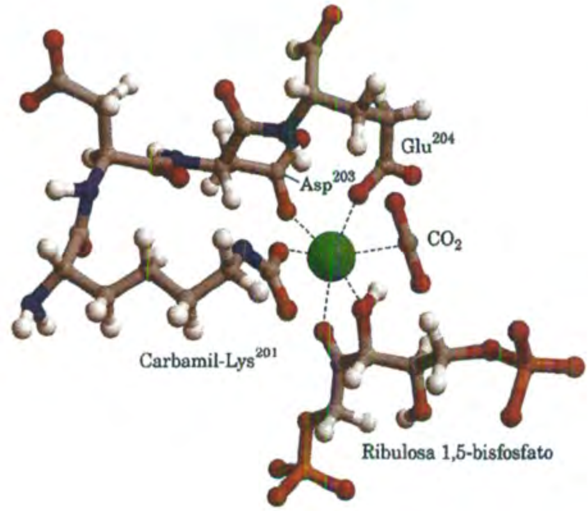


FIGURA 20–6 Papel central del Mg^{2+} en el mecanismo catalítico de la rubisco. (De PDB ID 1RXO). El Mg^{2+} está coordinado en un complejo aproximadamente octaédrico con seis átomos de oxígeno: un oxígeno en el carbamato de la Lys^{201}; dos en los grupos carboxilo de Glu^{204} y Asp^{203}; dos en C-2 y C-3 del sustrato, ribulosa 1,5-bisfosfato y uno en el otro sustrato, CO_2. Una molécula de agua ocupa el sitio de unión del CO_2 en esta estructura cristalina. En esta figura se ha modelado una molécula de CO_2 en su sitio. (La numeración de los residuos se refiere al enzima de espinaca.)

un ión Mg^{2+} unido. El ión Mg^{2+} pone en contacto y orienta los reactivos en el sitio activo **(Fig. 20–6)** al tiempo que polariza el CO_2 exponiéndolo al ataque nucleofílico por el intermedio de la reacción **(Fig. 20–7)**, un enediolato de cinco carbonos, for-

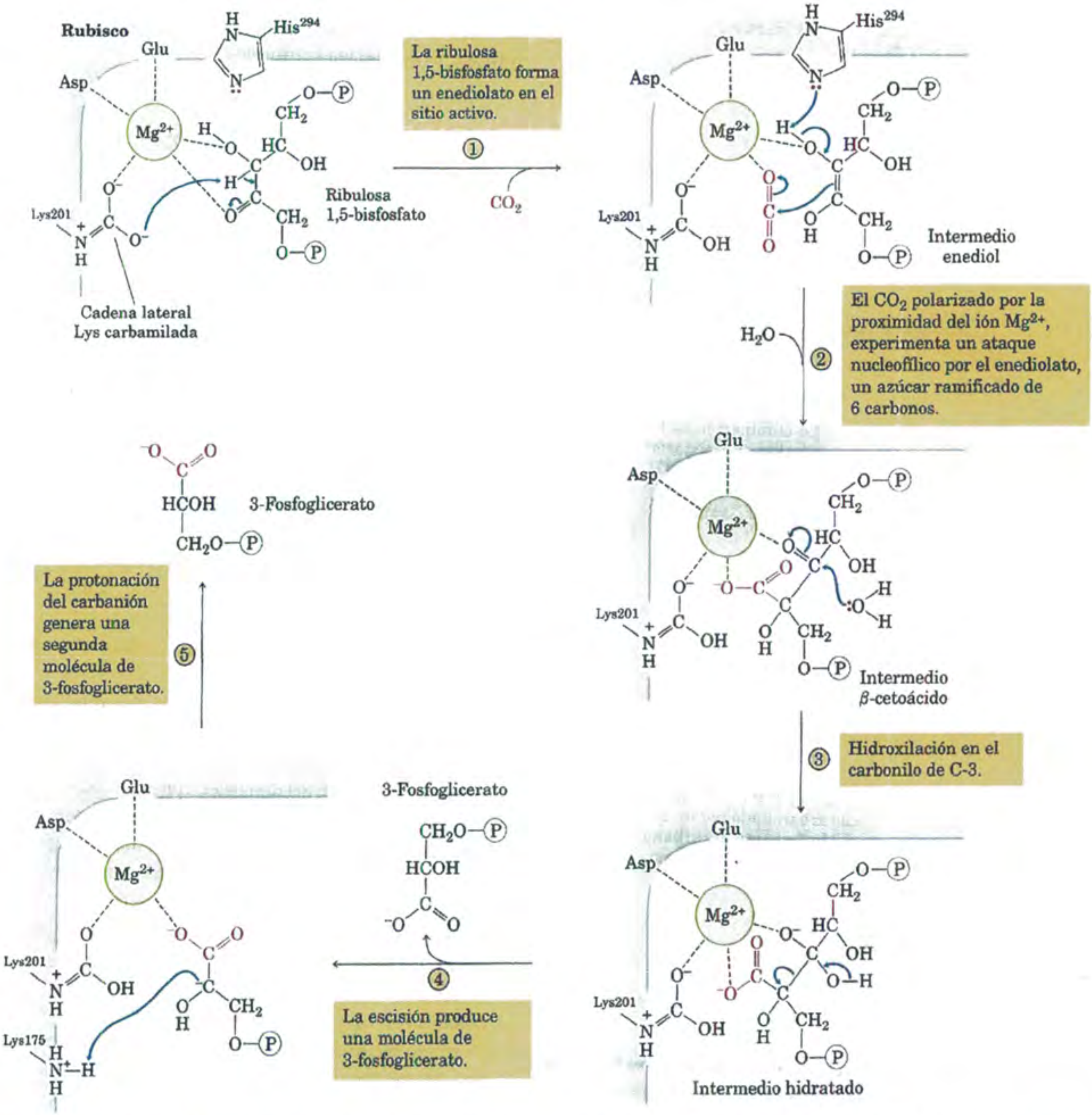


FIGURA DE MECANISMO 20–7 Primera fase de la asimilación de CO_2: actividad carboxilasa de la rubisco. La reacción de fijación de CO_2 está catalizada por la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco). La reacción global consigue la combinación de un CO_2 y una ribulosa 1,5-bisfosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato, uno de los cuales contiene el átomo de carbono del CO_2 (rojo). En transferencias de protones adicionales (no mostradas) tienen lugar en varias etapss con la intervención de Lys^{201}, Lys^{175} e His^{294}.

Mecanismo de la rubisco; tutoría rubisco

mado sobre el enzima. El intermedio de seis carbonos resultante se rompe dando dos moléculas de 3-fosfoglicerato.

Como catalizador del primer paso de la asimilación fotosintética de CO_2, la rubisco es una diana principal para la regulación. El enzima es inactivo hasta que se carbamila en el grupo ϵ-amino de la Lys²⁰¹ **(Fig. 20–8)**. La ribulosa 1,5-bisfosfato inhibe la carbamilación al unirse fuertemente al sitio activo, con lo que bloquea el enzima en la conformación "cerrada" en la que la Lys²⁰¹ es inaccesible. La **rubisco activasa** supera la inhibición al promover la liberación de la ribulosa 1,5-bisfosfato dependiente de ATP, exponiendo el grupo amino de la Lys a la carbamilación no enzimática por el CO_2; ello va seguido de la fijación de Mg^{2+}, que activa la rubisco. La rubisco activasa de algunas especies es activada por la luz mediante un mecanismo redox (véase la Fig. 20–19).

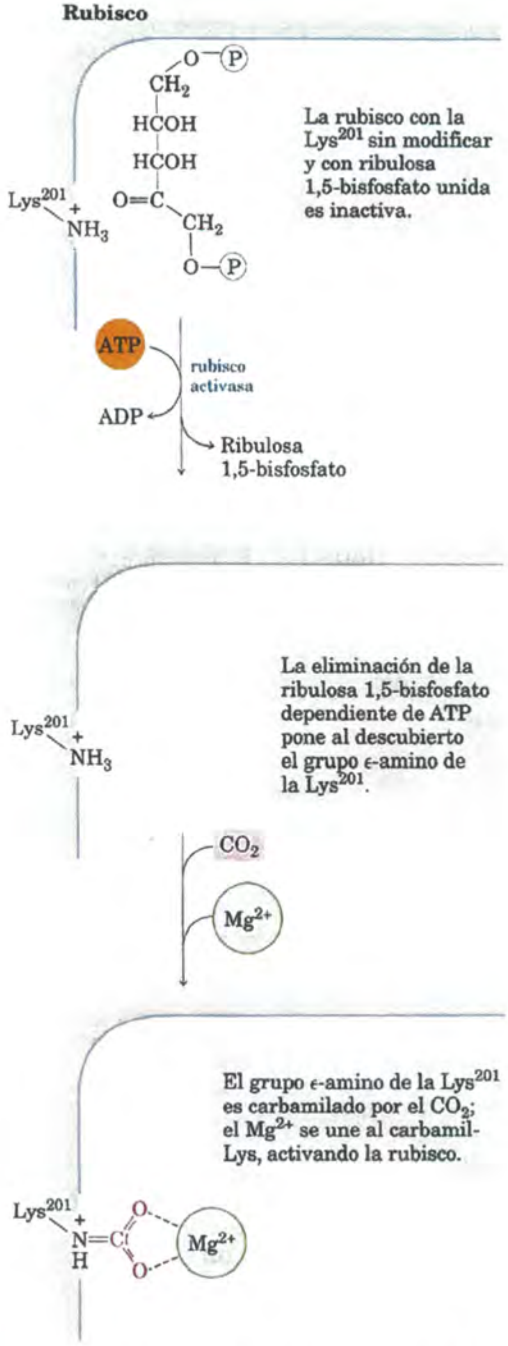
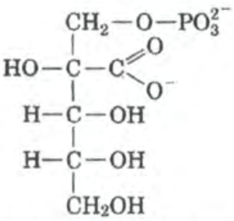


FIGURA 20–8 Papel de la rubisco activasa en la carbamilación de la Lys²⁰¹ de la rubisco. Cuando el sustrato ribulosa 1,5-bisfosfato está unido al sitio activo, la Lys²⁰¹ no es accesible. La rubisco activasa acopla la hidrólisis de ATP con la expulsión del azúcar bisfosfato unido, exponiendo la Lys²⁰¹; este residuo Lys puede ser ahora carbamilado con CO_2 en una reacción que aparentemente no está facilitada por un enzima. El Mg^{2+} es atraído por la carbamil-Lys cargada negativamente y se une a ella, con lo que se activa el enzima.

Otro mecanismo regulador implica el "inhibidor nocturno" 2-carboxiarabinitol 1-fosfato, un análogo del estado de transición presente en la naturaleza (véase el Recuadro 6–3) con una estructura similar al del intermedio β-cetoácido de la reacción de la rubisco (Fig. 20–7; véase también la Fig. 20–20). Este compuesto, sintetizado en la oscuridad por algunas plantas, es un potente inhibidor de la rubisco carbamilada. Es degradado cuando vuelve la luz o es expelido por la rubisco activasa, lo que activa la rubisco.

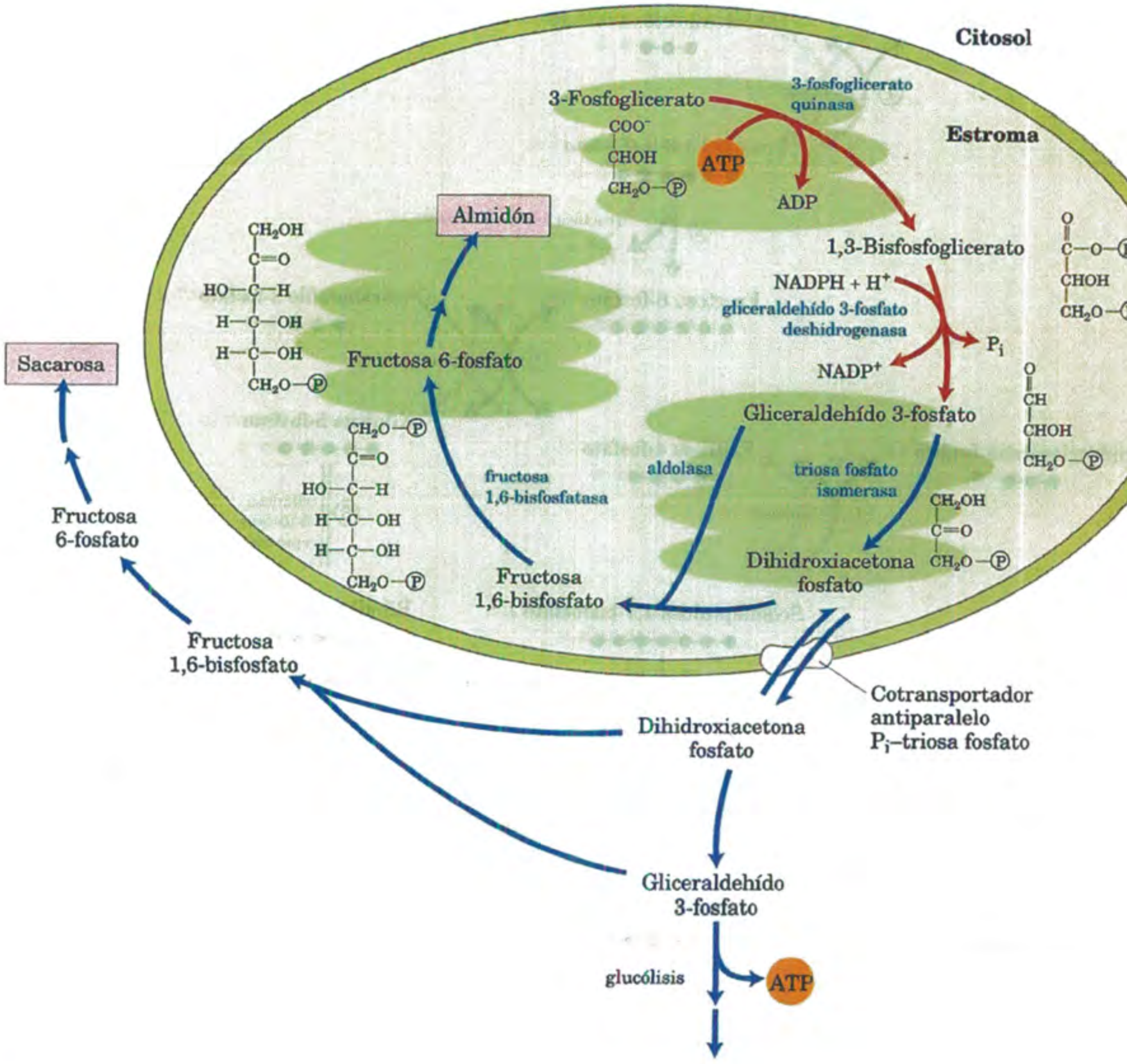


2-Carboxiarabinitol 1-fosfato

Fase 2: Conversión del 3-fosfoglicerato en gliceraldehído 3-fosfato El 3-fosfoglicerato formado en la fase 1 se convierte en gliceraldehído 3-fosfato en dos pasos que son, básicamente, el inverso de los pasos correspondientes en la glucólisis, con una excepción: el cofactor nucleotídico para la reducción del 1,3-bisfosfoglicerato es el NADPH y no el NADH **(Fig. 20–9)**. El estroma del cloroplasto contiene todos los enzimas glucolíticos excepto la fosfoglicerato mutasa. Los enzimas del estroma son isozimas de los que se encuentran en el citosol; ambos conjuntos de enzimas catalizan las mismas reacciones, pero son el producto de genes diferentes.

En el primer paso de la fase 2, la **3-fosfoglicerato quinasa** del estroma cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP al 3-fosfoglicerato, dando 1,3-bisfosfoglicerato. A continuación el NADPH dona electrones en una reducción catalizada por el isozima específico del cloroplasto de la **gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa,** produciendo gliceraldehído 3-fosfato y P_i. La triosa fosfato isomerasa interconvierte a continuación el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. La mayor parte de las triosas fosfato así producidas se utilizan para regenerar la ribulosa 1,5-bisfosfato; el resto se convierte en almidón en el cloroplasto, que es almacenado para su uso posterior, o se exporta inmediatamente al citosol y se convierte en sacarosa para su transporte hacia partes de la planta en crecimiento. En las hojas en desarrollo, una parte significativa de las triosas fosfato puede ser degradada por la glucólisis para obtener energía.

Fase 3: Regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato a partir de triosas fosfato La primera reacción en la asimilación



20–9 Segunda fase de la asimilación de CO_2. El 3-fosfoglicerato se te en gliceraldehído 3-fosfato (flechas rojas). También se muestran los s alternativos del carbono fijado del gliceraldehído 3-fosfato (flechas . La mayor parte del gliceraldehído 3-fosfato se recicla a ribulosa fosfato como se muestra en la Fig. 20–10. Una pequeña parte del gliceraldehído 3-fosfato "extra" puede utilizarse inmediatamente como fuente de energía, pero la mayoría se convierte en sacarosa para el transporte o se almacena en forma de almidón en el cloroplasto. En este último caso el gliceraldehído 3-fosfato se condensa con dihidroxiacetona fosfato en el estroma convirtiéndose en fructosa 1,6-bisfosfato que es un precursor del almidón. En otras situaciones, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en dihidroxiacetona fosfato que abandona el cloroplasto vía un transportador específico (véase la Fig. 20–15) y, en el citosol, se puede degradar glucolíticamente para producir energía o utilizarse para formar fructosa 6-fosfato y, por tanto, sacarosa.

de CO_2 para dar triosas fosfato consume ribulosa 1,5-bisfosfato. Para el flujo continuo de CO_2 hacia los glúcidos se debe regenerar constantemente la ribulosa 1,5-bisfosfato. Esto se consigue con una serie de reacciones **(Fig. 20–10)** que, junto con las fases 1 y 2, forman la ruta cíclica que se muestra en la Figura 20–4. El producto de la primera reacción de asimilación (3-fosfoglicerato) experimenta una serie de transformaciones que regeneran la ribulosa 1,5-bisfosfato. Entre los intermediarios de esta ruta se cuentan azúcares de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos. En la discusión siguiente todos los números de paso se refieren a la Figura 20–10.

Los pasos ① y ② están catalizados por el mismo enzima, la **aldolasa,** que cataliza primero la condensación reversible del gliceraldehído 3-fosfato con la dihidroxiacetona fosfato, dando fructosa 1,6-bisfosfato (paso ①); ésta se corta a fructosa 6-fosfato y P_i por la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) en el paso ②. La reacción es muy exergónica y prácticamente irreversible. El paso ③ es catalizado por la **transcetolasa,** que contiene tiamina pirofosfato (TPP) como grupo prostético (véase la Fig. 14–14a) y requiere Mg^{2+}. La transcetolasa cataliza la transferencia reversible de un grupo cetol de dos carbonos (CH_2OH—CO—) desde una cetosa fosfato dadora, la fructosa 6-fosfato, a una aldosa fosfato aceptora, el gliceraldehído 3-fosfato **(Fig. 20–11a, b),** formando la pentosa xilulosa 5-fosfato y la tetrosa eritrosa 4-fosfato. En el paso ④ la aldolasa actúa de nuevo combinando la eritrosa 4-fosfato con

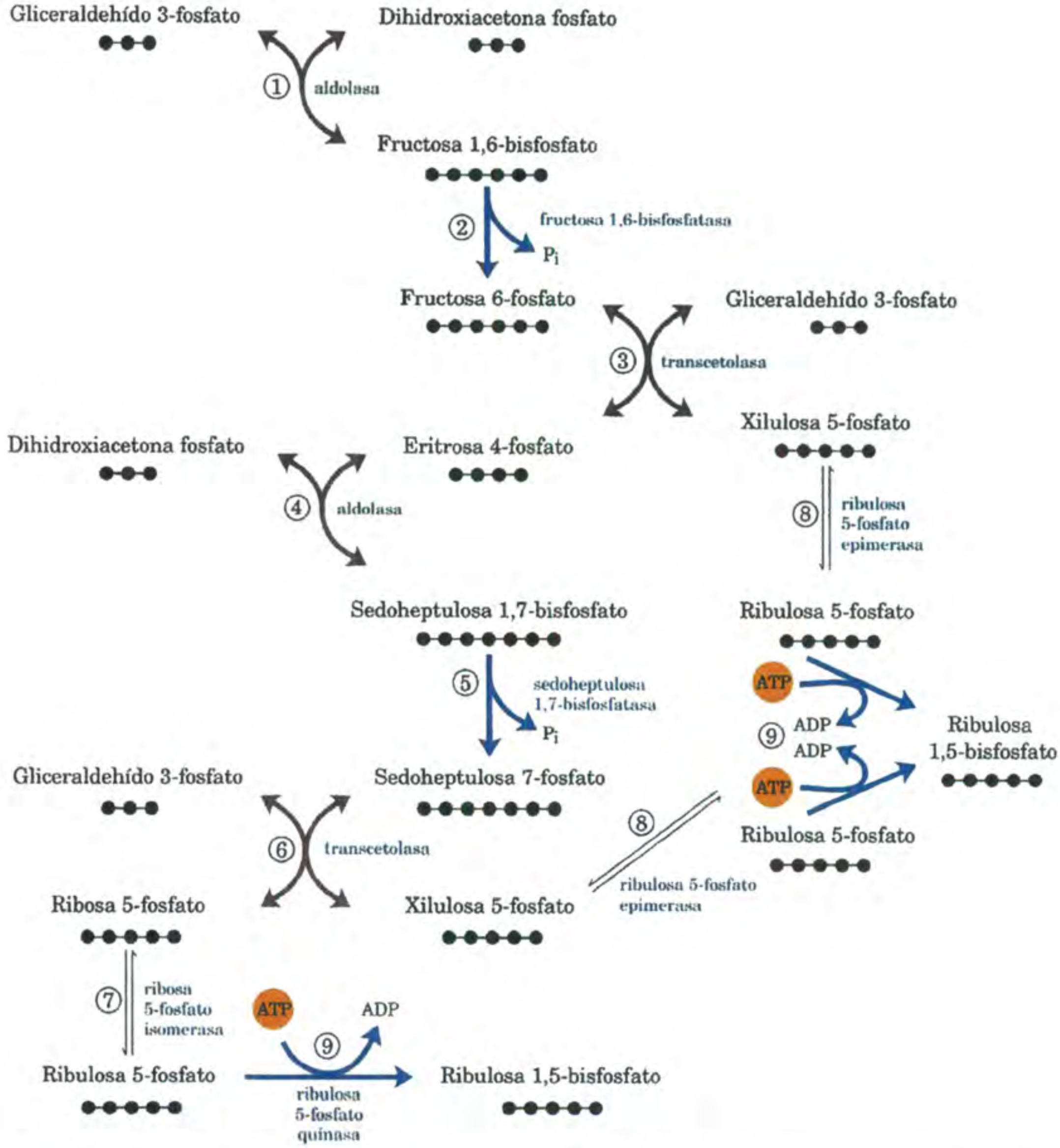


FIGURA 20–10 Tercera fase de la asimilación de CO_2. Este diagrama esquemático muestra las interconversiones de las triosas fosfato y las pentosas fosfato. Los círculos negros representan el número de carbonos de cada compuesto. Los materiales de partida son el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. Las reacciones catalizadas por la aldolasa (①y④) y la transcetolasa (③y ⑥) producen pentosas fosfato que se convierten en ribulosa 1,5-bisfosfato, ribosa 5-fosfato por la ribosa 5-fosfato isomerasa (⑦) y xilulosa 5-fosfato por la ribulosa 5-fosfato epimerasa (⑧). En el paso ⑨ la ribulosa 5-fosfato es fosforilada, regenerando ribulosa 1,5-bisfosfato. Los pasos con flechas azules son exergónicos y hacen que el proceso en su conjunto sea irreversible: paso ② fructosa 1,6-bisfosfatasa, ⑤ sedoheptulosa bisfosfatasa y ⑨ ribulosa 5-fosfato quinasa.

la dihidroxiacetona fosfato, dando la **sedoheptulosa 1,7-bisfosfato** de siete carbonos. Un enzima específico de los plastidios, la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa, convierte el bisfosfato en sedoheptulosa 7-fosfato (paso⑤); ésta es la segunda reacción irreversible de la ruta. La transcetolasa vuelve a actuar y convierte la sedoheptulosa 7-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato en dos pentosas fosfato en el paso ⑥ (Fig. 20–11c). La **Figura 20–12** muestra cómo un fragmento de dos carbonos es transportado temporalmente en el cofactor de la transcetolasa, el TPP, y condensado con los tres carbonos del gliceraldehído 3-fosfato en el paso ⑥.

Las pentosas fosfato formadas en las reacciones de la transcetolasa (ribosa 5-fosfato y xilulosa 5-fosfato) se convierten en **ribulosa 5-fosfato** (pasos ⑦ y ⑧) que, en el paso final del ciclo (paso ⑨), se fosforila a ribulosa 1,5-bisfosfato por la ribulosa 5-fosfato quinasa **(Fig. 20–13)**. Ésta es la tercera reacción muy exergónica de la ruta, ya que el enlace anhídrido fosfato del ATP se cambia por un éster fosfato en la ribulosa 1,5-bisfosfato.

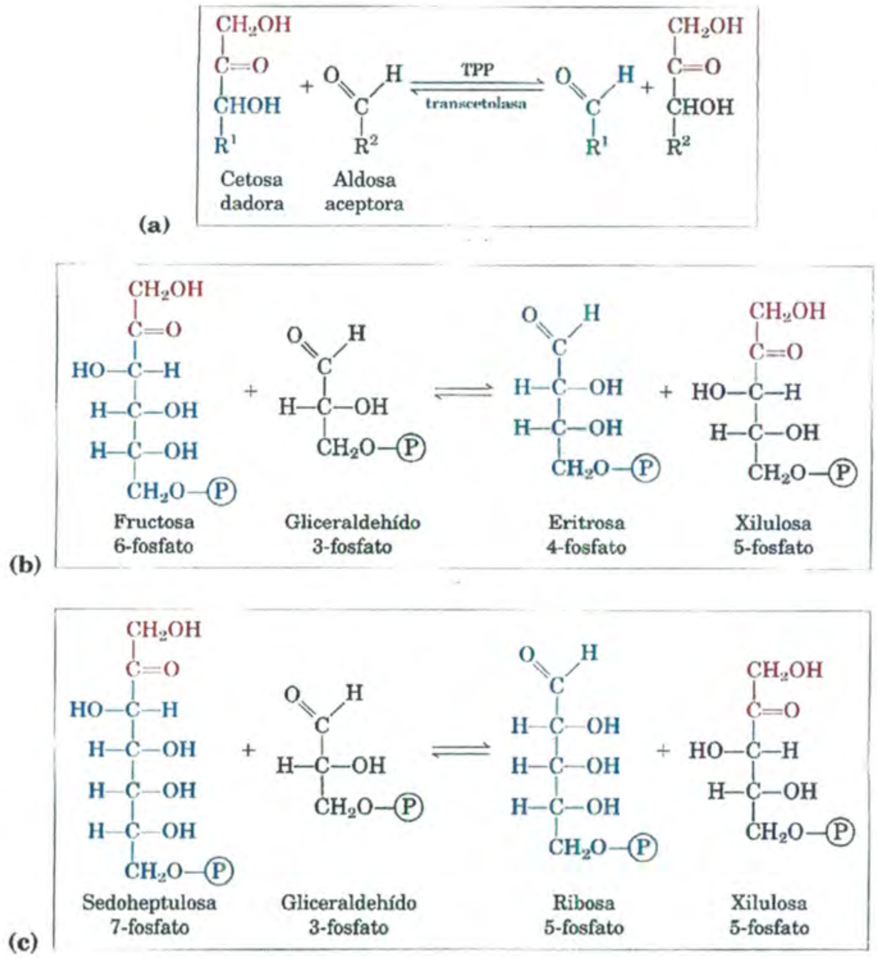


FIGURA 20–11 Reacciones catalizadas por la transcetolasa en el ciclo de Calvin. (a) Reacción general catalizada por la transcetolasa: la transferencia de un grupo de dos carbonos, transportado temporalmente por un TPP ligado al enzima, desde una cetosa dadora a una aldosa aceptora. (b) Conversión de una hexosa y una triosa en una pentosa y una tetrosa (paso ③ de la Fig. 20–10). (c) Conversión de azúcares de siete y tres carbonos en dos pentosas (paso ⑥ de la Fig. 20–10).

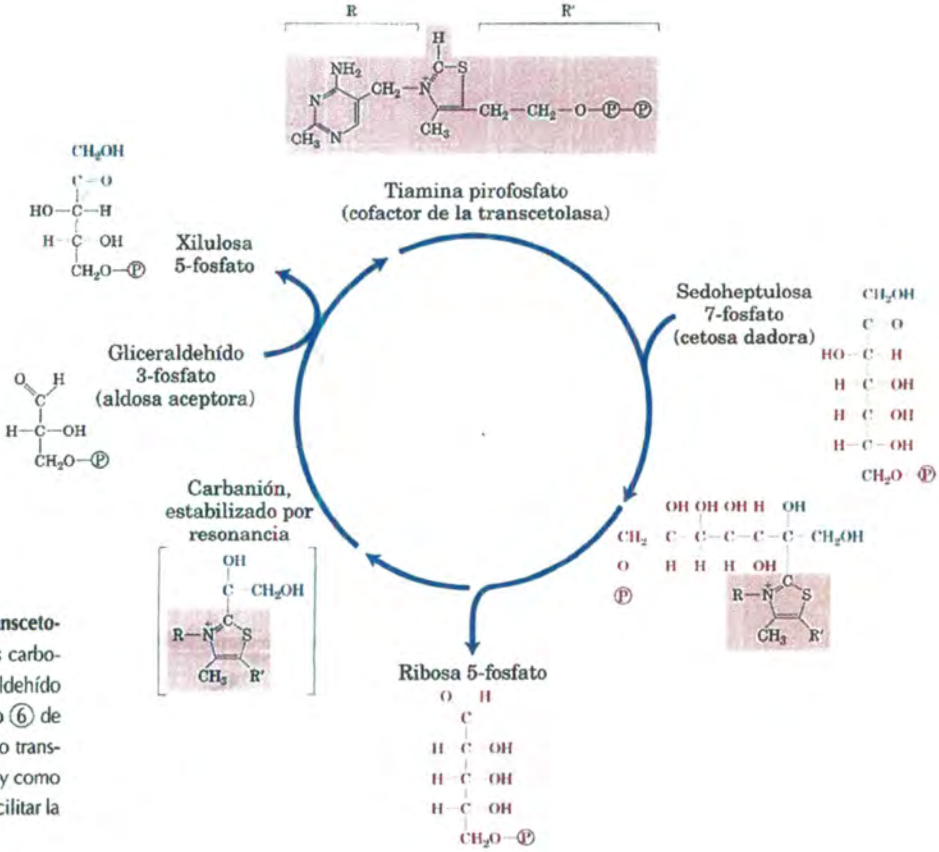


FIGURA 20–12 El TPP como cofactor de la transcetolasa. La transcetolasa transfiere un grupo de dos carbonos desde la sedoheptulosa 7-fosfato al gliceraldehído 3-fosfato, produciendo dos pentosas fosfato (paso ⑥ de la Fig. 20–10). La tiamina pirofosfato actúa como transportador temporal de la unidad de dos carbonos y como sumidero electrónico (véase la Fig. 14–14) para facilitar la reacción aquí mostrada.

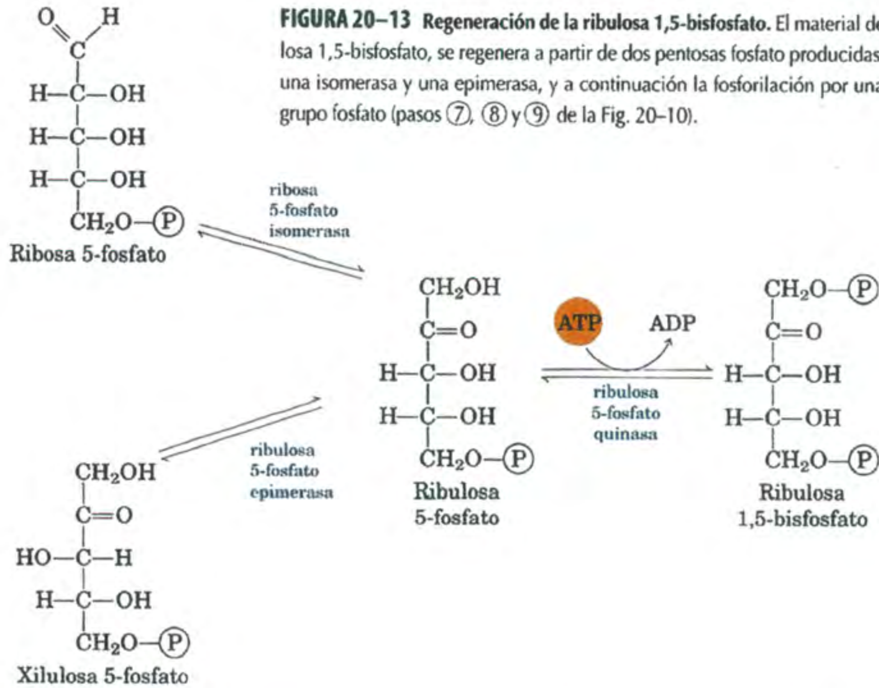


FIGURA 20–13 Regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato. El material de partida del ciclo de Calvin, la ribulosa 1,5-bisfosfato, se regenera a partir de dos pentosas fosfato producidas en el ciclo. En esta ruta intervienen una isomerasa y una epimerasa, y a continuación la fosforilación por una quinasa, con ATP como dador del grupo fosfato (pasos ⑦, ⑧ y ⑨ de la Fig. 20–10).

Cada triosa fosfato sintetizada a partir de CO_2 cuesta seis NADPH y nueve ATP

El resultado neto de tres vueltas del ciclo de Calvin es la conversión de tres moléculas de CO_2 y una molécula de fosfato en una molécula de triosa fosfato. En la **Figura 20–14** se muestra la estequiometría global de la ruta desde el CO_2 a triosa fosfato con regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato. Se condensan tres moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato (total de 15 carbonos) con tres moléculas de CO_2 (tres carbonos) formando seis moléculas de 3-fosfoglicerato (18 carbonos). Estas seis moléculas de 3-fosfoglicerato se reducen a seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (que están en equilibrio con la dihidroxiacetona fosfato) con gasto de seis ATP (en la síntesis de 1,3-bisfosfoglicerato) y seis NADPH (en la reducción del 1,3-bisfosfoglicerato a gliceraldehído 3-fosfato). El isozima de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa presente en los cloroplastos puede utilizar NADP como transportador electrónico, funcionando normalmente en la dirección de la reducción del 1,3-bisfosfoglicerato. Los isozimas citosólicos utilizan NAD, al igual que los enzimas

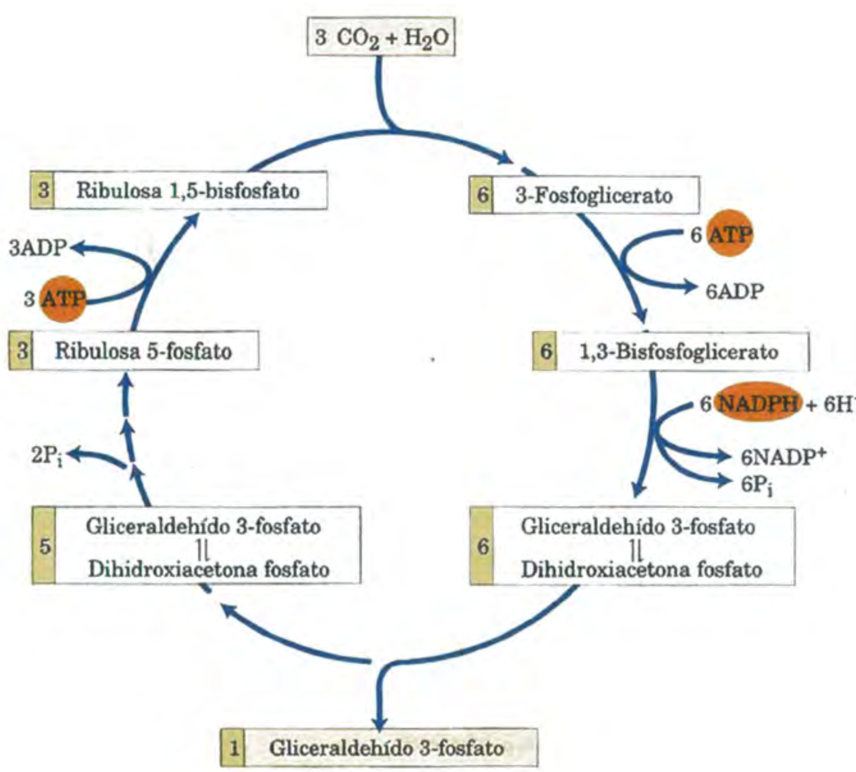


FIGURA 20–14 Estequiometría de la asimilación de CO_2 en el ciclo de Calvin. Por cada tres moléculas de CO_2 fijadas, se produce una molécula de triosa fosfato (gliceraldehído 3-fosfato) y se consumen nueve ATP y seis NADPH.

glucolíticos de los animales y otros eucariotas, y en la oscuridad este isozima actúa en la glucólisis oxidando el gliceraldehído 3-fosfato. Los dos isozimas de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, al igual que todos los enzimas, catalizan la reacción en ambas direcciones.

Una molécula de gliceraldehído 3-fosfato es el producto neto de la ruta de asimilación del carbono. Las otras cinco moléculas de triosa fosfato (15 carbonos) se reordenan en los pasos ① a ⑨ de la Figura 20–10 para formar tres moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato (15 carbonos). El último paso de esta conversión requiere un ATP por ribulosa 1,5-bisfosfato, es decir, un total de tres ATP. Así, por cada molécula de triosa fosfato producida por la asimilación fotosintética del CO_2 se requieren seis NADPH y nueve ATP.

El NADPH y el ATP se producen en las reacciones de la fotosíntesis dependientes de la luz con aproximadamente la misma razón (2:3) en que son consumidas en el ciclo de Calvin. Nueve moléculas de ATP se convierten en ADP y fosfato en la generación de una molécula de triosa fosfato; ocho de los fosfatos se liberan en forma de P_i que se combinan con ocho ADP para regenerar ATP. El noveno fosfato se incorpora en la propia triosa fosfato. Para convertir el noveno ADP en ATP, se ha de importar una molécula de P_i del citosol, tal como veremos más adelante.

En la oscuridad cesa la producción de ATP y NADPH por la fotofosforilación, deteniéndose también la incorporación de CO_2 en triosa fosfato (por las llamadas reacciones oscuras). Las "reacciones oscuras" de la fotosíntesis se denominaron de este modo para distinguirlas de las reacciones *primarias*, impulsadas por la luz, de transferencia de electrones al $NADP^+$ y de síntesis de ATP, descritas en el Capítulo 19. De hecho, en la oscuridad estas reacciones no transcurren a velocidades significativas, por lo que estas reacciones se denominan con mayor propiedad **reacciones de asimilación carbono.** Describiremos más adelante en esta sección los mecanismos reguladores que inician la asimilación de carbono en presencia de luz y la detienen en la oscuridad.

Dentro del estroma del cloroplasto se encuentran todos los enzimas necesarios para convertir las triosas fosfato producidas por la asimilación del CO_2 (gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato) en almidón, que se almacena temporalmente en el cloroplasto en forma de gránulos insolubles. La aldolasa condensa las triosas a fructosa 1,6-bisfosfato; la fructosa 1,6-bisfosfatasa produce fructosa-6-fosfato; la fosfohexosa isomerasa da glucosa 6-fosfato, y la fosfoglucomutasa produce glucosa 1-fosfato, material de partida para la síntesis de almidón (véase la Sección 20.3).

Todas las reacciones del ciclo de Calvin, excepto las catalizadas por la rubisco, la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa y la ribulosa 5-fosfato quinasa, también tienen lugar en tejidos animales. Debido a la falta de estos tres enzimas los animales no pueden llevar a cabo la conversión neta de CO_2 en glucosa.

Un sistema de transporte exporta triosas fosfato desde el cloroplasto e importa fosfato

La membrana interna del cloroplasto es impermeable a la mayoría de compuestos fosforilados, entre ellos fructosa 6-fosfato, glucosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bisfosfato. Hay, sin embargo, un cotransportador antiparalelo específico que cataliza el intercambio, uno por uno, de P_i con una triosa fosfato, dihidroxiacetona fosfato o bien 3-fosfoglicerato (**Fig. 20–15**; véase también la Fig. 20–9). Este cotransportador antiparalelo traslada simultáneamente P_i al interior del cloroplasto, donde es utilizado en la fotofosforilación, y triosa fosfato fuera del cloroplasto hacia el citosol, donde se puede utilizar para sintetizar sacarosa, la forma en la que se transporta el carbono fijado a tejidos de la planta alejados.

La síntesis de sacarosa en el citosol y la síntesis de almidón en el cloroplasto son las rutas principales de "recolección" del exceso de triosas fosfato de la fotosíntesis. La síntesis de sacarosa (descrita más adelante) libera cuatro moléculas de P_i de las cuatro triosas fosfato requeridas para producir sacarosa. Por cada molécula de triosa fosfato eliminada del cloroplasto,

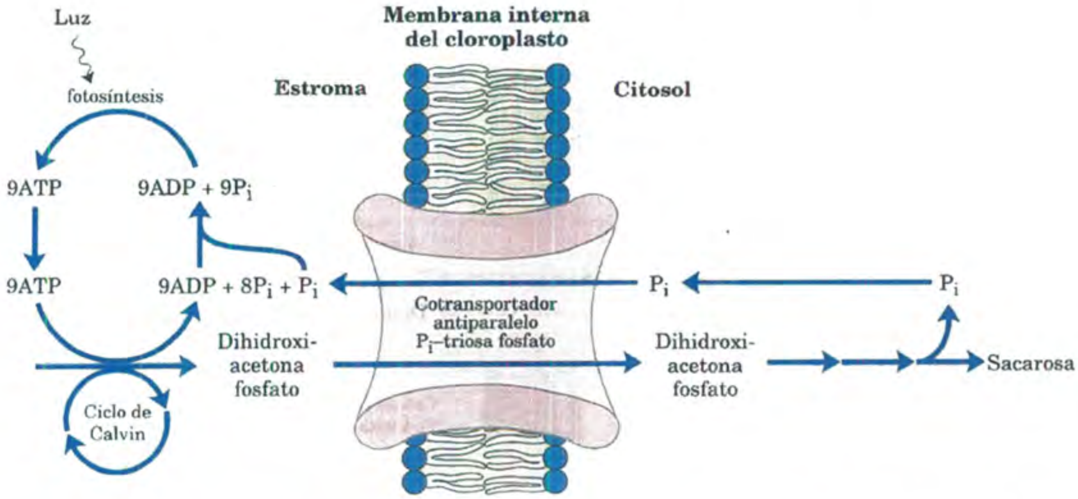


FIGURA 20–15 Sistema de cotransporte antiparalelo P_i–triosa fosfato de la membrana interna del cloroplasto. Este transportador facilita el intercambio de P_i citosólico por dihidroxiacetona fosfato del estroma. Los productos de la asimilación fotosintética del carbono se transportan de este modo al citosol, en donde se utilizan como material de partida para la biosíntesis de sacarosa, mientras que el P_i requerido para la fotofosforilación pasa al estroma. Este mismo sistema de cotransporte antiparalelo puede transportar 3-fosfoglicerato y actúa en la lanzadera para exportar ATP y equivalentes de reducción (véase la Fig. 20–16).

se transporta un P_i a su interior, proporcionando la novena molécula de P_i mencionada anteriormente que se utiliza para regenerar el ATP. Si se bloquease este intercambio, la síntesis de triosa fosfato pronto agotaría el P_i disponible en el cloroplasto, con lo que la síntesis de ATP sería más lenta y se suprimiría la asimilación de CO_2 en almidón.

Este sistema de cotransporte antiparalelo P_i–triosa fosfato cumple una función adicional. En el citosol se necesita ATP y poder reductor para diversas reacciones sintéticas que requieren energía. Estos requerimientos son atendidos hasta un grado todavía no determinado por la mitocondria, pero una segunda fuente potencial de energía son el ATP y el NADPH generados en el estroma del cloroplasto durante las reacciones luminosas. Sin embargo, ni el ATP y ni el NADPH pueden cruzar la membrana del cloroplasto. El sistema de cotransporte antiparalelo P_i–triosa fosfato tiene el efecto indirecto de trasladar equivalentes de ATP y equivalentes de reducción a través de la membrana del cloroplasto al citosol **(Fig. 20–16)**. La dihidroxiacetona fosfato formada en el estroma se transporta al citosol, en donde se convierte mediante enzimas glucolíticos en 3-fosfoglicerato generando ATP y NADH. El 3-fosfoglicerato vuelve a entrar en el cloroplasto completando el ciclo.

Cuatro enzimas del ciclo de Calvin son activados indirectamente por la luz

La asimilación reductora del CO_2 requiere mucho ATP y NADPH, aumentando sus concentraciones en el estroma cuando se iluminan los cloroplastos **(Fig. 20–17)**. El transporte de protones inducido por la luz a través de la membrana del tilacoide (Capítulo 19) también aumenta el pH del estroma, de 7 hasta aproximadamente 8, acompañado de un flujo de Mg^{2+} desde el compartimiento del tilacoide hacia el estroma, aumentando la $[Mg^{2+}]$ de 1-3 mM a 3-6 mM. Varios enzimas del estroma han evolucionado de forma que pueden aprovecharse de estas condiciones inducidas por la luz, que indican la disponibilidad de ATP y NADPH: estos enzimas son más activos en un ambiente alcalino y de alta $[Mg^{2+}]$. Por ejemplo, la activación de la rubisco por formación de la carbamil-lisina es más rápida a pH alcalino, y la alta $[Mg^{2+}]$ en el estroma favorece la formación del complejo enzi-

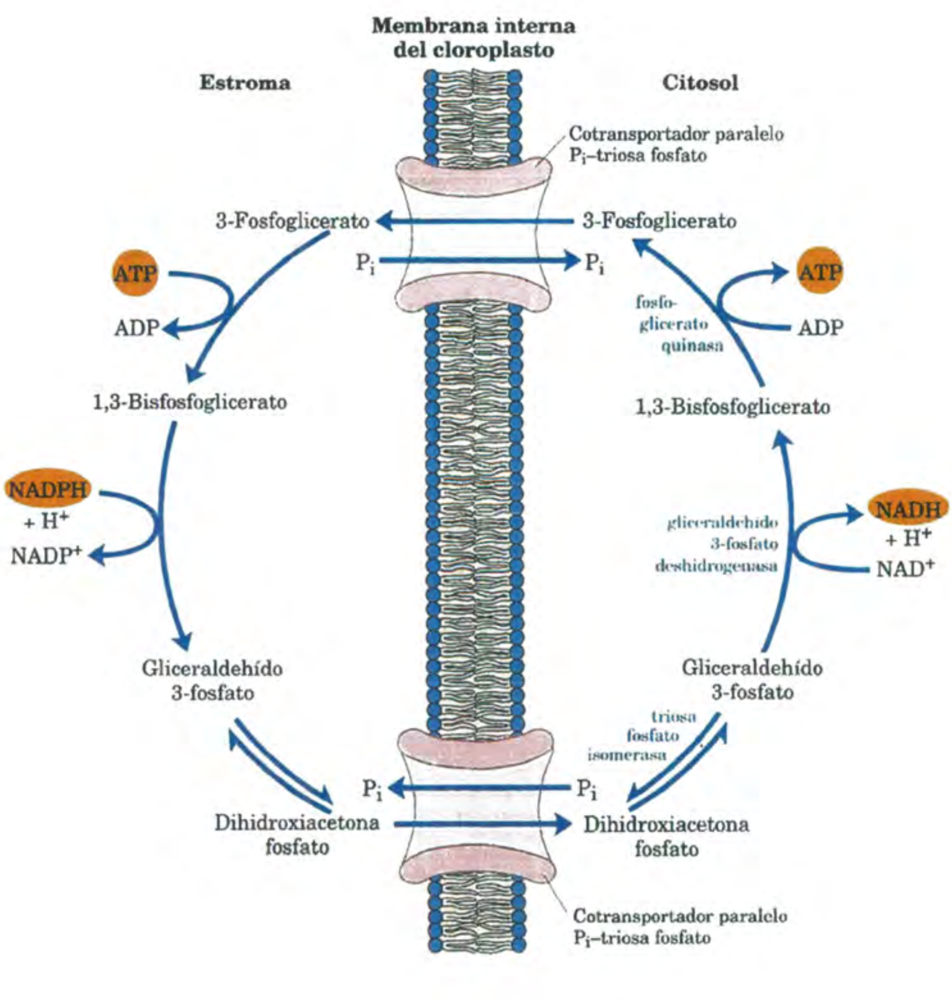


FIGURA 20–16 Papel del cotransportador antiparalelo de P_i–triosa fosfato en el transporte de ATP y equivalentes de reducción. La dihidroxiacetona fosfato abandona el cloroplasto y se convierte en gliceraldehído 3-fosfato en el citosol. Las reacciones de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa citosólica y de la fosfoglicerato quinasa producen a continuación NADH, ATP y 3-fosfoglicerato. Éste vuelve a entrar en el cloroplasto y se reduce a dihidroxiacetona fosfato, lo que completa un ciclo que transporta efectivamente ATP y equivalentes de reducción (NAD(P)H) desde el cloroplasto al citosol.

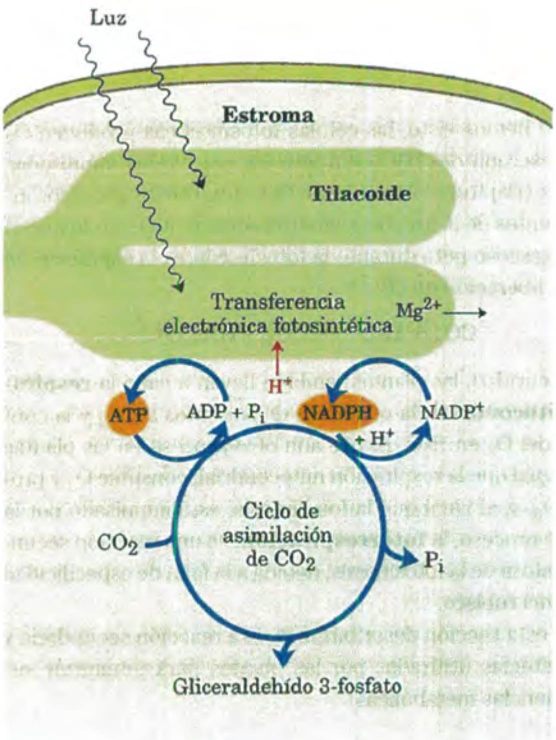


FIGURA 20–17 Fuente de ATP y NADPH. El ATP y NADPH producidos por las reacciones luminosas son sustratos esenciales para la reducción del CO_2. Las reacciones fotosintéticas que producen ATP y NADPH van acompañadas del movimiento de protones (rojo) desde el estroma al tilacoide, creando condiciones alcalinas en el estroma. Pasan iones Mg^{2+} desde el tilacoide al estroma, con lo que aumenta la $[Mg^{2+}]$ del estroma.

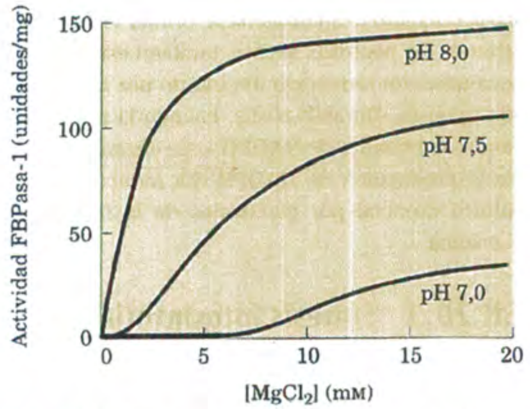


FIGURA 20–18 Activación de la fructosa 1,6-bisfosfatasa del cloroplasto. La fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) reducida es activada por la luz y una combinación de pH elevado y alta $[Mg^{2+}]$ en el estroma, ambos producidos por la iluminación.

ma-Mg^{2+} activo. La fructosa 1,6-bisfosfatasa requiere Mg^{2+} y es muy dependiente del pH **(Fig. 20–18)**; su actividad se incrementa en un factor de más de 100 cuando el pH y la $[Mg^{2+}]$ aumentan durante la iluminación de los cloroplastos.

Cuatro enzimas del ciclo de Calvin están sujetos a un tipo especial de regulación por la luz. La ribulosa 5-fosfato quinasa, la fructosa 1,6-bisfosfatasa, la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa son activadas mediante una reducción inducida por la luz de los puentes disulfuro entre dos residuos Cys esenciales para sus actividades catalíticas. Cuando estos residuos Cys están formando puentes disulfuro (oxidados), los enzimas son inactivos; ésta es la situación normal en condiciones de oscuridad. Con la iluminación, los electrones fluyen desde el fotosistema I a la ferredoxina (véase la Fig. 19–56), que pasa electrones a una proteína pequeña y soluble que contiene disulfuros denominada **tiorredoxina (Fig. 20–19)**, en una reacción catalizada por la **ferredoxina-tiorredoxina reductasa.** La tiorredoxina reducida cede electrones para la reducción de los puentes disulfuro de los enzimas activados por la luz, y estas reacciones de rotura reductora van acompañadas de cambios de conformación que aumentan la actividad de los enzimas. Al anochecer, los residuos Cys de los cuatro enzimas se reoxidan a su forma disulfuro, los enzimas quedan inactivados y no se consume ATP en la asimilación de CO_2. En su lugar, el almidón sintetizado y almacenado durante el día se degrada como combustible para la glucólisis durante la noche.

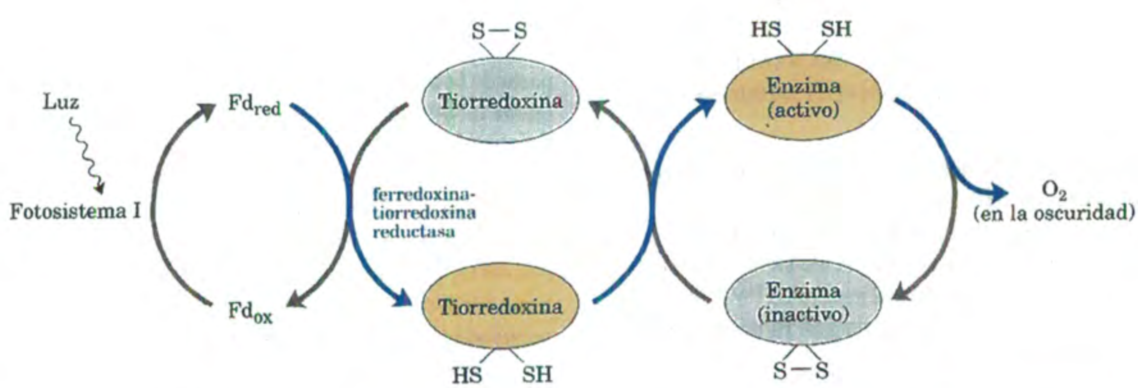


FIGURA 20–19 Activación por la luz de varios enzimas del ciclo de Calvin. La activación por la luz está facilitada por la tiorredoxina, una proteína pequeña que contiene grupos disulfuro. Con la luz, la tiorredoxina es reducida por electrones que se desplazan desde el fotosistema I a través de la ferredoxina (Fd) (flechas azules); a continuación la tiorredoxina reduce los enlaces disulfuro críticos en los enzimas sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, ribulosa 5-fosfato quinasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, activando así estos enzimas. En la oscuridad los grupos —SH se reoxidan a disulfuros, inactivando los enzimas.

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, primer enzima de la ruta *oxidativa* de las pentosas fosfato, también está regulada por este mecanismo de reducción impulsado por la luz, pero en el sentido opuesto. Durante el día, cuando la fotosíntesis produce grandes cantidades de NADPH, este enzima no es necesario para la producción de NADPH. La reducción de un enlace disulfuro esencial por electrones de la ferredoxina *inactiva* el enzima.

RESUMEN 20.1 Síntesis fotosintética de glúcidos

- En las plantas vasculares, la fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos. En las reacciones de asimilación de CO_2 (ciclo de Calvin), se utiliza ATP y NADPH para reducir el CO_2 a triosas fosfato. Estas reacciones tienen lugar mediante tres fases: la reacción de fijación propiamente dicha catalizada por la rubisco; la reducción del 3-fosfoglicerato resultante a gliceraldehído 3-fosfato, y finalmente la regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato a partir de las triosas fosfato.
- La rubisco condensa CO_2 con la ribulosa 1,5-bisfosfato formando una hexosa bisfosfato inestable que a continuación se rompe, dando dos moléculas de 3-fosfoglicerato. La rubisco es activada por modificación covalente (carbamilación de la Lys^{201}) catalizada por la rubisco activasa y es inhibida por un análogo natural del estado de transición, cuyas concentraciones aumentan en la oscuridad y disminuyen durante el día.
- Isozimas de los enzimas glucolíticos que se encuentran en el estroma catalizan la reducción del 3-fosfoglicerato a gliceraldehído 3-fosfato; cada molécula reducida requiere un ATP y un NADPH.
- Enzimas presentes en el estroma, entre ellos la transcetolasa y la aldolasa, reordenan los esqueletos carbonados de las triosas fosfato, generando intermediarios de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos que dan lugar finalmente a pentosas fosfato. Las pentosas fosfato se convierten en ribulosa 5-fosfato y a continuación se fosforilan a ribulosa 1,5-bisfosfato, completando de este modo el ciclo de Calvin.
- El coste energético para la fijación de tres CO_2 en forma de triosa fosfato es de nueve ATP y seis NADPH, que son proporcionados por las reacciones de la fotosíntesis dependientes de la luz.
- Un cotransportador antiparalelo de la membrana interna del cloroplasto intercambia P_i en el citosol por 3-fosfoglicerato o dihidroxiacetona fosfato producidos por la asimilación de CO_2 en el estroma. La oxidación de la dihidroxiacetona fosfato en el citosol genera ATP y NADH, transportando así ATP y equivalentes de reducción desde el cloroplasto al citosol.
- Cuatro de los enzimas del ciclo de Calvin son activados indirectamente por la luz y son inactivos en la oscuridad, de manera que la síntesis de hexosa no compite con la glucólisis, que es necesaria para obtener energía en la oscuridad.

20.2 Fotorrespiración y rutas C_4 y CAM

Tal como hemos visto, las células fotosintéticas producen O_2 (por la escisión del H_2O) durante las reacciones impulsadas por la luz (Capítulo 19) y utilizan CO_2 durante los procesos independientes de la luz (descritos anteriormente), por lo que el cambio gaseoso neto durante la fotosíntesis es la captación de CO_2 y la liberación de O_2:

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow O_2 + (CH_2O)$$

En la oscuridad, las plantas también llevan a cabo la **respiración mitocondrial,** la oxidación de sustratos a CO_2 y la conversión del O_2 en H_2O. Existe aún otro proceso en las plantas que, al igual que la respiración mitocondrial, consume O_2 y produce CO_2, y, al igual que la fotosíntesis, está impulsado por la luz. Este proceso, la **fotorrespiración,** es una reacción secundaria costosa de la fotosíntesis, debida a la falta de especificidad del enzima rubisco.

En esta sección describiremos esta reacción secundaria y las estrategias utilizadas por las plantas para minimizar sus consecuencias metabólicas.

La fotorrespiración es el resultado de la actividad oxigenasa de la rubisco

La rubisco no tiene una especificidad absoluta por el CO_2 como sustrato. El oxígeno molecular (O_2) compite con el CO_2 en el sitio activo, y en aproximadamente uno de cada tres o cuatro ciclos catalíticos, la rubisco cataliza la condensación del O_2 con la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar 3-fosfoglicerato y **2-fosfoglicolato (Fig. 20–20)**, un producto sin utilidad metabólica. Ésta es la actividad oxigenasa del enzima que se hace evidente en su nombre completo: ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa.

La reacción con el O_2 no da lugar a fijación de carbono y parece ser un inconveniente neto para la célula en la que tiene lugar; la recuperación de los carbonos del fosfoglicolato (por la ruta que se indicará más adelante) utiliza cantidades significativas de energía celular y libera parte del CO_2 fijado previamente.

Dado que la reacción con el oxígeno es perjudicial para el organismo, ¿por qué la evolución de la rubisco produjo un sitio activo incapaz de discriminar bien entre CO_2 y O_2? Quizá gran parte de la evolución tuvo lugar antes de que hace aproximadamente 2.500 millones de años la producción de O_2 por parte de los organismos fotosintéticos empezase a elevar el contenido en oxígeno de la atmósfera. Antes de aquel momento no existía una presión selectiva para que la rubisco discriminase entre el CO_2 y el O_2. La K_m para el CO_2 es de aproximadamente 9 μM y para el O_2 es alrededor de 350 μM. La atmósfera moderna contiene cerca de 20% de O_2 y sólo 0,04% de CO_2, por lo que una solución acuosa en equilibrio con el aire a temperatura ambiente contiene alrededor de 250 μM O_2 y 11 μM CO_2, concentraciones que permiten que la "fijación" de O_2 por la rubisco sea importante y, por consiguiente, constituya un desperdicio de energía significativo. La dependencia de la temperatura de las solubilidades del O_2 y del CO_2 es tal que a temperaturas elevadas la razón O_2:CO_2 en solución aumenta. Además, la afinidad

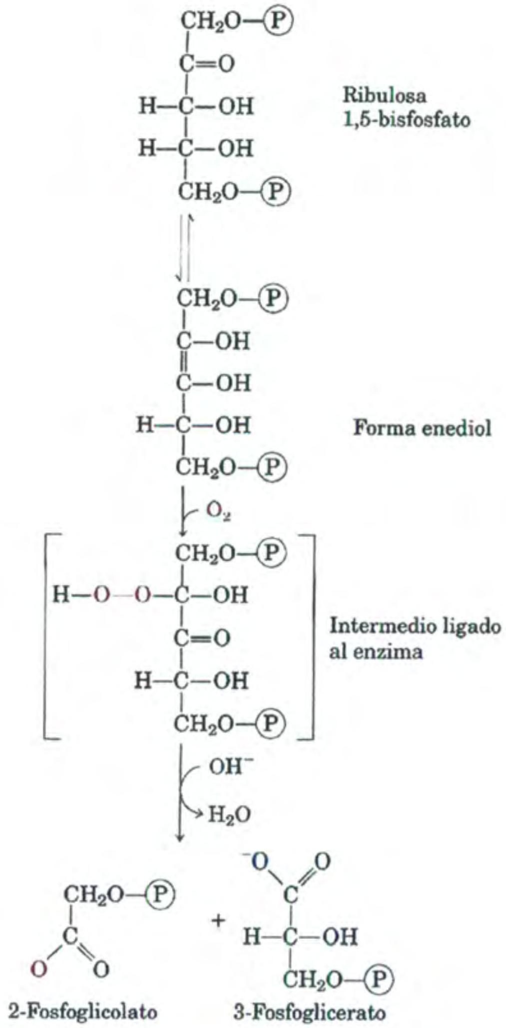


FIGURA 20–20 Actividad oxigenasa de la rubisco. La rubisco puede incorporar O_2 en lugar de CO_2 sobre la ribulosa 1,5-bisfosfato. El intermedio inestable así formado se escinde en 2-fosfoglicolato (que se recicla tal como se describe en la Fig. 20–21) y en 3-fosfoglicerato, que puede volver a entrar en el ciclo de Calvin.

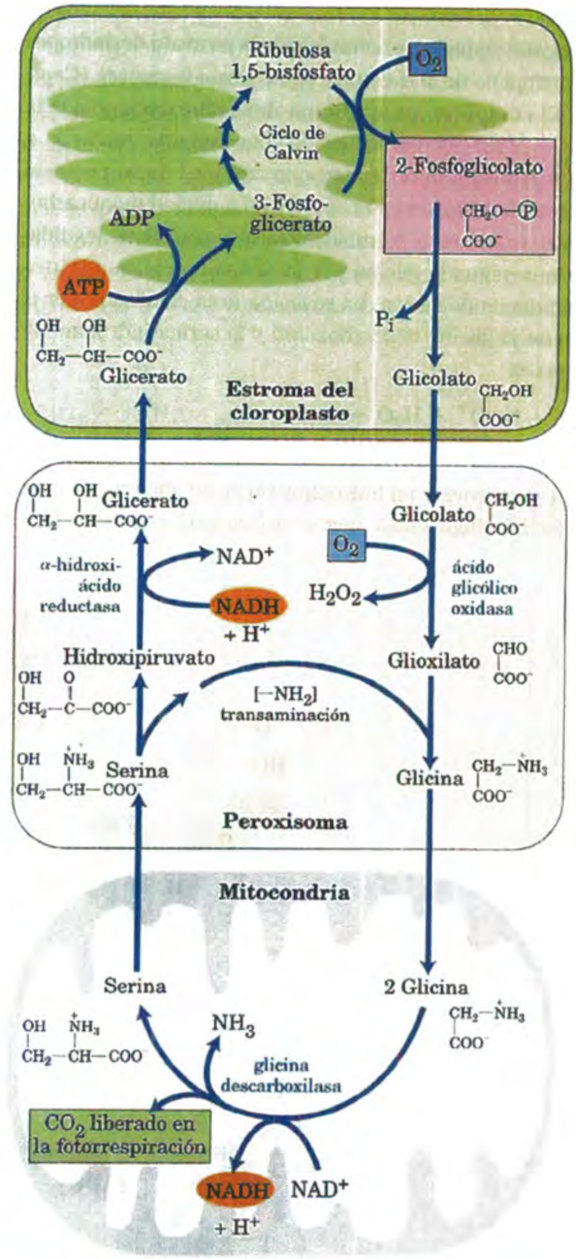


FIGURA 20–21 Ruta del glicolato. En esta ruta, mediante la cual se recupera el 2-fosfoglicolato (sombreado en rosa) convirtiéndolo en serina y, finalmente, en 3-fosfoglicerato, intervienen tres compartimientos celulares. El glicolato formado por desfosforilación del 2-fosfoglicolato en los cloroplastos se oxida a glioxilato en los peroxisomas y a continuación se transamina a glicina. En la mitocondria se condensan dos moléculas de glicina, formando serina y CO_2 liberado durante la fotorrespiración (sombreado en verde). Esta reacción está catalizada por la glicina descarboxilasa, enzima presente a concentraciones muy elevadas en las mitocondrias de las plantas C_3 (véase el texto). La serina se convierte en hidroxipiruvato y luego en glicerato en los peroxisomas; el glicerato vuelve a entrar en el cloroplasto para ser fosforilado, incorporándose al ciclo de Calvin. Durante la fotorrespiración se consume oxígeno en dos pasos (sombreados en azul).

de la rubisco por el CO_2 disminuye al aumentar la temperatura, exacerbando la tendencia del enzima a catalizar la inútil reacción de la oxigenasa. Y puesto que el CO_2 se consume en la reacciones de asimilación, la proporción de O_2 a CO_2 en los espacios aéreos de la hoja aumenta, con lo que todavía se favorece más la reacción de la oxigenasa.

La ruta de recuperación del fosfoglicolato es costosa

La **ruta del glicolato** convierte dos moléculas de 2-fosfoglicolato en una molécula de serina (tres carbonos) y una molécula de CO_2 **(Fig. 20–21)**. En el cloroplasto una fosfatasa convierte el 2-fosfoglicolato en glicolato, que se exporta al peroxisoma. Allí, el glicolato es oxidado por el oxígeno molecular y el aldehído resultante (glioxilato) se transamina, dando glicina. El peróxido de hidrógeno formado como producto secundario de la oxidación del glioxilato se vuelve inocuo por acción de las peroxidasas del peroxisoma. La glicina pasa del peroxisoma a la matriz mitocondrial, en donde experimenta una descarboxilación oxidativa por el complejo de la glicina descarboxilasa, enzima que es similar en estructura y mecanismo a dos complejos mito-

condriales ya estudiados: el complejo de la piruvato deshidrogenasa y el complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa (Capítulo 16). El **complejo de la glicina descarboxilasa** oxida la glicina a CO_2 y NH_3, con la reducción concomitante del NAD^+ a NADH y la transferencia del carbono restante de la glicina al cofactor tetrahidrofolato **(Fig. 20–22)**. La unidad monocarbonada transportada en el tetrahidrofolato se transfiere seguidamente a una segunda glicina por la serina hidroximetiltransferasa, produciendo serina. La reacción neta catalizada por el complejo de la glicina descarboxilasa y la serina hidroximetiltransferasa es

$$2\ \text{Glicina} + NAD^+ + H_2O \longrightarrow \text{serina} + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+$$

La serina se convierte en hidroxipiruvato, en glicerato y, finalmente, en 3-fosfoglicerato, que se utiliza para regenerar la ribulosa 1,5-bisfosfato, completando este largo, y caro, ciclo (Fig. 20–21).

Con una luz solar brillante, el flujo a través de la ruta de recuperación del glicolato puede ser muy elevado, produciendo CO_2 unas cinco veces más que el que se produce de forma normal por todas las oxidaciones del ciclo del ácido cítrico. Para producir este gran flujo, las mitocondrias contienen cantidades enormes del complejo de la glcina descarboxilasa: ¡las cuatro proteínas del complejo constituyen la *mitad* de todas las proteínas de la matriz mitocondrial en las hojas de guisante y de espinaca! En las partes de la planta no fotosintéticas, tales como los tubérculos, las mitocondrias contienen concentraciones muy bajas del complejo de la glicina descarboxilasa.

La actividad combinada de la rubisco oxigenasa y la ruta de recuperación del glicolato consume O_2 y produce CO_2; de ahí el nombre de **fotorrespiración.** Quizá un nombre mejor

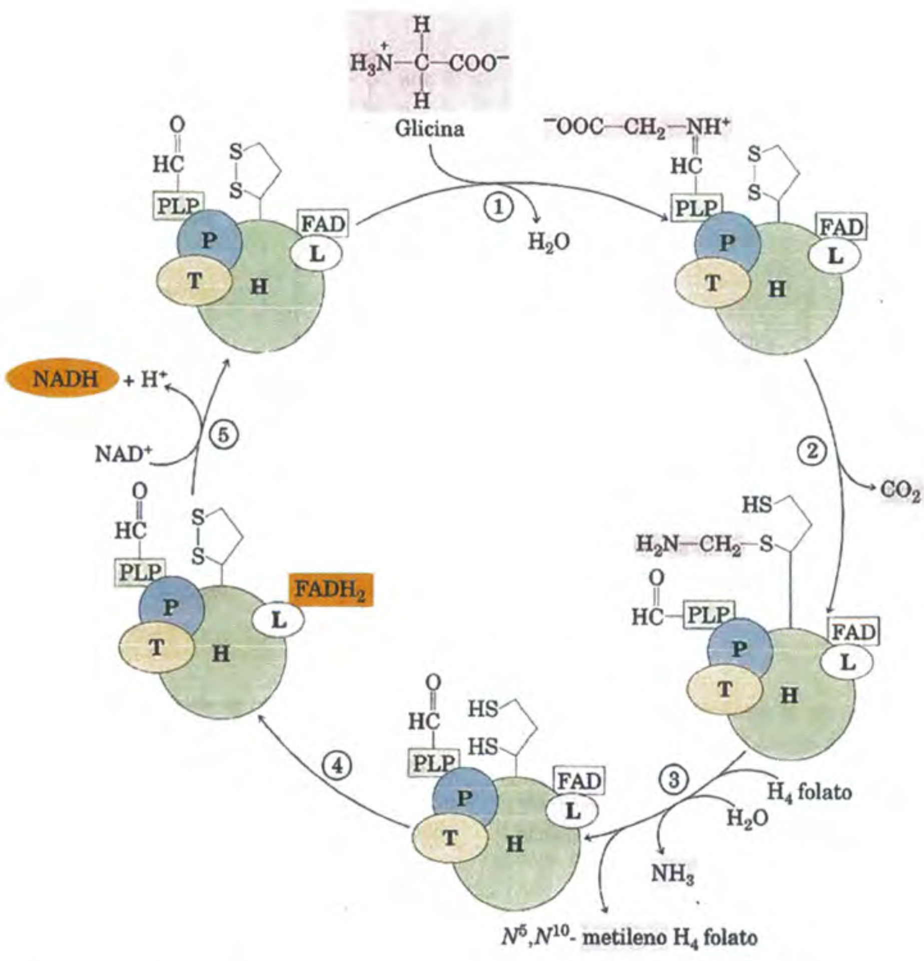


FIGURA 20–22 Sistema de la glicina descarboxilasa. La glicina descarboxilasa de las mitocondrias de las plantas es un complejo formado por cuatro tipos de subunidades, con la siguiente estequiometría: $P_4H_{27}T_9L_2$. La proteína H tiene un residuo de ácido lipoico unido covalentemente que puede experimentar oxidación reversible. El paso ① es la formación de una base de Schiff entre el piridoxal fosfato (PLP) y glicina, catalizada por la proteína P (así denominada porque contiene PLP). En el paso ②, la proteína P cataliza la descarboxilación oxidativa de la glicina, liberando CO_2; el grupo metilamino restante se une a uno de los grupos —SH del ácido lipoico reducido. ③ La proteína T (que utiliza tetrahidrofolato (H_4 folato) como cofactor) libera ahora NH_3 de la porción metilamina y transfiere el fragmento monocarbonado restante al tetrahidrofolato, produciendo N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato. ④ La proteína L oxida los dos grupos —SH del ácido lipoico a disulfuro, pasando electrones al NAD^+ a través del FAD ⑤, completando así el ciclo. El N^5, N^{10}-metilenotetrahidrofolato formado en este proceso es utilizado por la serina hidroximetiltransferasa para convertir una molécula de glicina en serina, regenerando el tetrahidrofolato que es esencial para la reacción catalizada por la proteína T. La subunidad L de la glicina descarboxilasa es idéntica a la dihidrolipoil deshidrogenasa (E_3) de la piruvato deshidrogenasa y la α-cetoglutarato deshidrogenasa (véase la Fig. 16–6).

para esta ruta sería **ciclo fotosintético oxidativo del carbono** o **ciclo C_2,** nombres que no invitan a la comparación con la respiración en las mitocondrias. A diferencia de la respiración mitocondrial, la "fotorrespiración" no conserva energía y puede de hecho inhibir la formación neta de biomasa hasta en un 50%. Esta ineficiencia ha llevado a adaptaciones evolutivas en los procesos de asimilación de carbono, especialmente en plantas que han aparecido en climas cálidos.

En las plantas C_4, la fijación del CO_2 y la actividad rubisco están espacialmente separadas

En muchas plantas que crecen en los trópicos (así como en las plantas cultivadas en zonas templadas pero de origen tropical tales como el maíz, la caña de azúcar y el sorgo) se ha desarrollado un mecanismo para evitar el problema de la fotorrespiración despilfarradora. El paso en el que el CO_2 se fija en un producto de tres carbonos, el 3-fosfoglicerato, está precedido de varios pasos, uno de los cuales es una fijación preliminar del CO_2 sobre un compuesto de cuatro carbonos. Las plantas que utilizan este proceso son conocidas como **plantas C_4,** y el proceso de asimilación como **metabolismo C_4** o **ruta C_4.** Las plantas que utilizan el método de asimilación de carbono que hemos descrito hasta el momento, en las que el *primer paso* es la reacción del CO_2 con la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar 3-fosfoglicerato, se denominan **plantas C_3.**

Las plantas C_4, que típicamente crecen en condiciones de altas intensidades luminosas y temperatura elevada, tienen varias características importantes: alta velocidad fotosintética, alta velocidad de crecimiento, baja tasa de fotorrespiración, baja tasa de pérdida de agua y una estructura especializada de la hoja. En la fotosíntesis que tiene lugar en las hojas de las plantas C_4 intervienen dos tipos de células: células mesófilas y células túnico-vasculares (**Fig. 20–23a**). Existen tres variantes del metabolismo C_4, descubierto en la década de 1960 por Marshall Hatch y Rodger Slack (Fig. 20–23b).

En las plantas de origen tropical el primer intermediario en el que se ha fijado el $^{14}CO_2$ es el oxalacetato, un compuesto de cuatro carbonos. Esta reacción, que tiene lugar en el citosol de las células mesófilas de las hojas, está catalizada por la **fosfoenolpiruvato carboxilasa,** cuyo sustrato es el HCO_3^- y no el CO_2. El oxalacetato así formado se reduce a malato a expensas de NADPH (tal como se muestra en la Fig. 20–23b) o se convierte en aspartato por transaminación:

$$\text{Oxalacetato} + \alpha\text{-aminoácido} \longrightarrow \text{L-aspartato} + \alpha\text{-cetoácido}$$

El malato o el aspartato formados en las células mesófilas pasa seguidamente a las células vecinas túnico-vasculares a través de plasmodesmos, que son canales revestidos de proteína que co-

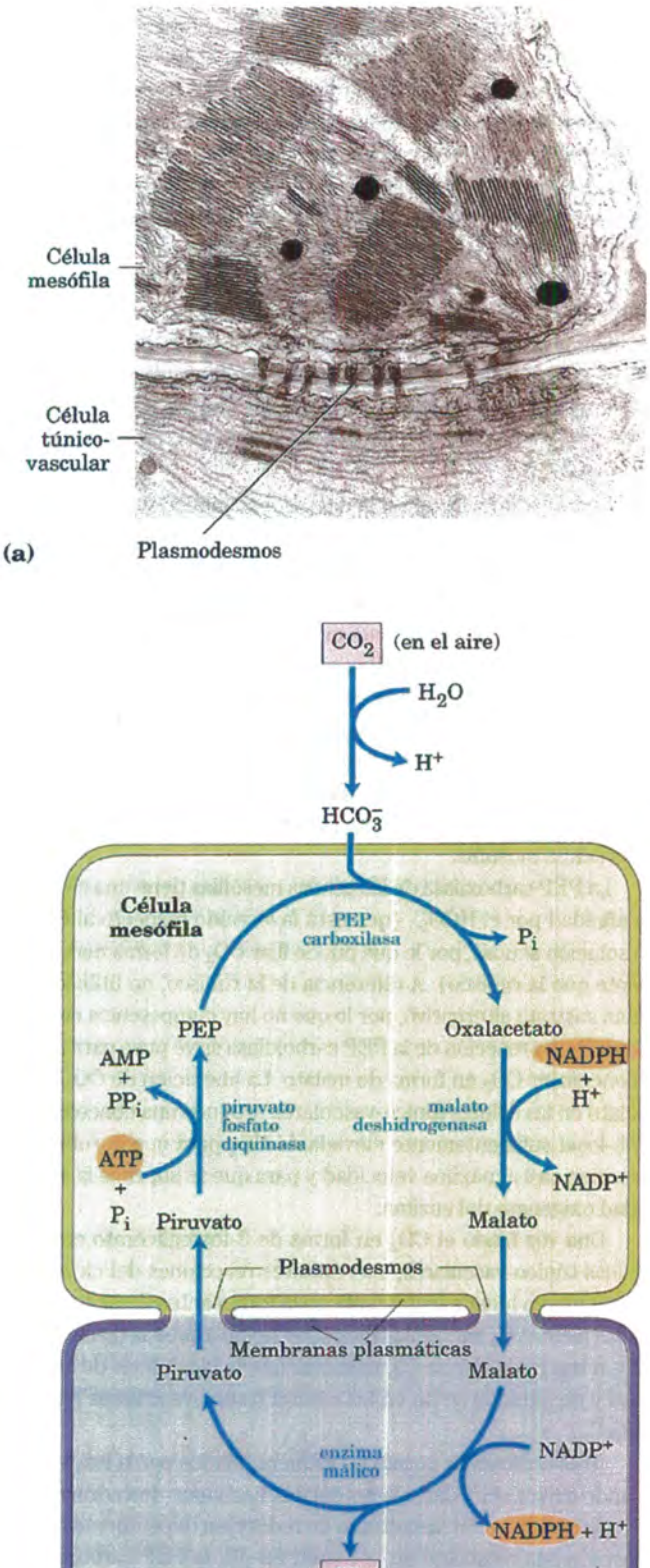


FIGURA 20–23 Asimilación de carbono en las plantas C_4. La ruta C_4, donde intervienen las células del mesófilo y las células túnico-vasculares, predomina en plantas de origen tropical. **(a)** Micrografía electrónica que muestra cloroplastos de células mesófilas y túnico-vasculares adyacentes. La célula túnico-vascular contiene gránulos de almidón. Los plasmodesmos que unen las dos células son evidentes. **(b)** Ruta C_4 de asimilación del CO_2, que transcurre a través de un intermediario de cuatro carbonos.

nectan dos células vegetales y proporcionan una vía para el movimiento de metabolitos e incluso de proteínas pequeñas entre células. En las células túnico-vasculares el malato se oxida y después se descarboxila para dar piruvato y CO_2 por acción del **enzima málico,** reduciendo $NADP^+$. En las plantas que utilizan el aspartato como transportador de CO_2, aquel se transamina primeramente para formar oxalacetato, que seguidamente se reduce a malato en las células túnico-vasculares antes de la liberación del CO_2 por el enzima málico o la PEP carboxiquinasa. Tal como se ha demostrado mediante experimentos de marcado, el CO_2 libre formado en las células túnico-vasculares es la misma molécula de CO_2 que se fijó originariamente en el oxalacetato en las células mesófilas. Este CO_2 es fijado de nuevo, en esta ocasión por la rubisco, en exactamente la misma reacción que se da en las plantas C_3: incorporación de CO_2 en el C-1 del 3-fosfoglicerato.

El piruvato formado en la descarboxilación del malato en las células túnico-vasculares se vuelve a transferir a las células mesófilas, donde se convierte en PEP mediante una reacción enzimática poco habitual catalizada por la **piruvato fosfato diquinasa** (Fig. 20–23b). Este enzima se denomina diquinasa porque se fosforilan simultáneamente dos moléculas diferentes a partir de una molécula de ATP: el piruvato se fosforila a PEP y el fosfato se fosforila a pirofosfato. El pirofosfato es hidrolizado posteriormente a fosfato, por lo que se utilizan dos grupos fosfato de alta energía del ATP en la regeneración del PEP. El PEP está ahora a punto para fijar otra molécula de CO_2 en la célula mesófila.

La PEP carboxilasa de las células mesófilas tiene una elevada afinidad por el HCO_3^-, (que está favorecido respecto al CO_2 en solución acuosa, por lo que puede fijar CO_2 de forma más eficiente que la rubisco). A diferencia de la rubisco, no utiliza O_2 como sustrato alternativo, por lo que no hay competencia entre CO_2 y O_2. La reacción de la PEP carboxilasa sirve pues para fijar y concentrar CO_2 en forma de malato. La liberación de CO_2 del malato en las células túnico-vasculares produce una concentración local suficientemente elevada de CO_2 para que la rubisco funcione casi a máxima velocidad y para que se suprima la actividad oxigenasa del enzima.

Una vez fijado el CO_2 en forma de 3-fosfoglicerato en las células túnico-vasculares, las restantes reacciones del ciclo de Calvin tienen lugar exactamente en la forma antes descrita. Así, en las plantas C_4 las células mesófilas llevan a cabo la fijación de CO_2 a través de la ruta C_4, mientras que la biosíntesis de sacarosa y de almidón se da en las células túnico-vasculares por la ruta C_3.

Tres enzimas de la ruta C_4 están regulados por la luz, mostrando mayor actividad a la luz del día. La malato deshidrogenasa es activada por el mecanismo de reducción dependiente de la tiorredoxina mostrado en la Figura 20–19; la PEP carboxilasa es activada por fosforilación de un residuo Ser y la piruvato fosfato diquinasa es activada por desfosforilación. En estos dos últimos casos no se conocen los detalles sobre la forma en que la luz afecta la fosforilación y la desfosforilación.

La ruta de asimilación de CO_2 en las plantas C_4 tiene un coste energético superior que en las plantas C_3. Por cada molécula de CO_2 asimilada en la ruta C_4, se ha de regenerar una molécula de PEP a expensas de dos grupos fosfato de alta energía del ATP. Así, las plantas C_4 necesitan un total de cinco ATP para fijar una molécula de CO_2, mientras que las plantas C_3 sólo necesitan tres (nueve por triosa fosfato). Cuando aumenta la temperatura (y por tanto la afinidad de la rubisco por el CO_2 disminuye, tal como se observó anteriormente) se alcanza un punto (alrededor de 28 a 30 °C) en el que el aumento de eficiencia por la eliminación de la fotorrespiración en las plantas C_4 compensa con creces este coste energético. Las plantas C_4 crecen más que las plantas C_3 durante el verano, como puede atestiguar fácilmente cualquier jardinero con cierta experiencia.

En las plantas CAM, la captura del CO_2 y la acción de la rubisco están separadas en el tiempo

Las plantas crasas tales como los cactus y la piña tropical, que son originarias de ambientes muy cálidos y muy secos, presentan otra variación respecto a la fijación fotosintética del CO_2, que reduce las pérdidas de vapor de agua a través de los poros (estomas) por los que tienen que entrar el CO_2 y el O_2 en el tejido de la hoja. En lugar de separar la captura inicial del CO_2 y su fijación por la rubisco a través del espacio (tal como hacen las plantas C_4), separan estos procesos en el tiempo. Por la noche, cuando el aire es más fresco y húmedo, los estomas se abren para permitir la entrada de CO_2, que es fijado en forma de oxalacetato por la PEP carboxilasa. El oxalacetato se reduce a malato y se almacena en las vacuolas para proteger a los enzimas citosólicos y de los plastidios del bajo pH producido por la disociación del ácido málico. Durante el día se cierran los estomas, impidiendo la pérdida de agua debida a las elevadas temperaturas diurnas, mientras que el CO_2 capturado en el malato durante la noche se libera en forma de CO_2 por el enzima málico ligado a NADP. Este CO_2 es ahora asimilado por acción de la rubisco y los enzimas del ciclo de Calvin. Debido a que este método se descubrió en plantas con floración perenne de la familia Crasuláceas, se denomina metabolismo ácido crasuláceo (*c*rassulacean *a*cid *m*etabolism) y las plantas se denominan **plantas CAM.**

RESUMEN 20.2 Fotorrespiración y rutas C_4 y CAM

- Cuando la rubisco utiliza O_2 en lugar de CO_2 como sustrato, el 2-fosfoglicolato formado se elimina mediante una ruta dependiente de oxígeno. El resultado es un incremento en el consumo de O_2: la *fotorrespiración* o, de forma más precisa, el ciclo fotosintético oxidativo del carbono o ciclo C_2. El 2-fosfoglicolato se convierte en glioxilato, glicina y finalmente en serina en una ruta en la que intervienen enzimas del estroma del cloroplasto, del peroxisoma y de la mitocondria.
- En las plantas C_4 la ruta de asimilación del carbono minimiza la fotorrespiración: el CO_2 se fija primeramente en las células mesófilas, dando un compuesto de cuatro carbonos que pasa a las células túnico-vasculares y libera CO_2 a altas concentraciones. Este CO_2 liberado es fijado por la rubisco, dándose el resto de reacciones del ciclo de Calvin al igual que en las plantas C_3.

- En las plantas CAM, el CO_2 se fija en forma de malato en la oscuridad y se almacena en vacuolas hasta que llega la luz del día. Los estomas están ahora cerrados (se minimizan las pérdidas de agua) y el malato sirve como fuente de CO_2 para la rubisco.

20.3 Biosíntesis del almidón y la sacarosa

Durante la fotosíntesis activa con luz intensa, una hoja de planta produce más glúcidos (en forma de triosas fosfato) de los necesarios para generar energía o sintetizar precursores. El exceso se convierte en sacarosa y se transporta a otras partes de la planta para ser utilizada como combustible o para su almacenamiento. En la mayoría de plantas el almidón es la principal forma de almacenamiento, pero en algunas plantas, tales como la remolacha y la caña de azúcar, la sacarosa es la forma principal de almacenamiento. La síntesis de la sacarosa y del almidón tiene lugar en compartimientos celulares diferentes (citosol y plastidios, respectivamente). Estos procesos están coordinados mediante diversos mecanismos de regulación que responden a cambios en la intensidad de la luz y a la velocidad de fotosíntesis.

La ADP-glucosa es el sustrato de la síntesis de almidón en los plastidios de las plantas y de la síntesis de glucógeno en las bacterias

El almidón, al igual que el glucógeno, es un polímero de masa molecular elevada formado por D-glucosa en enlace (α1→4). La síntesis de almidón tiene lugar en los cloroplastos para almacenamiento temporal como uno de los productos finales estables de la fotosíntesis, y en los amiloplastos de las partes no fotosintéticas de las plantas (semillas, raíces y tubérculos) para almacenamiento a largo plazo.

El mecanismo de activación de la glucosa en la síntesis de almidón es similar al de la síntesis del glucógeno. Se forma un **nucleótido-azúcar** activado, **ADP-glucosa** en este caso, por condensación de glucosa 1-fosfato con ATP en una reacción prácticamente irreversible debido a la presencia de pirofosfato inorgánico hidrolasa en los plastidios (p. 508). A continuación la **almidón sintasa** transfiere residuos de glucosa desde la ADP-glucosa a moléculas de almidón preexistentes. Aunque se daba generalmente por sentado que la glucosa se adicionaba al extremo *no reductor* del almidón, al igual que en la síntesis del glucógeno (véase la Fig. 15–30), los datos actuales sugieren que la almidón sintasa tiene dos sitios activos equivalentes que alternan en la inserción de un residuo glucosilo en el extremo *reductor* de la cadena en crecimiento. Este extremo permanece unido covalentemente al enzima, primero en un sitio activo, luego en el otro **(Fig. 20–24)**.

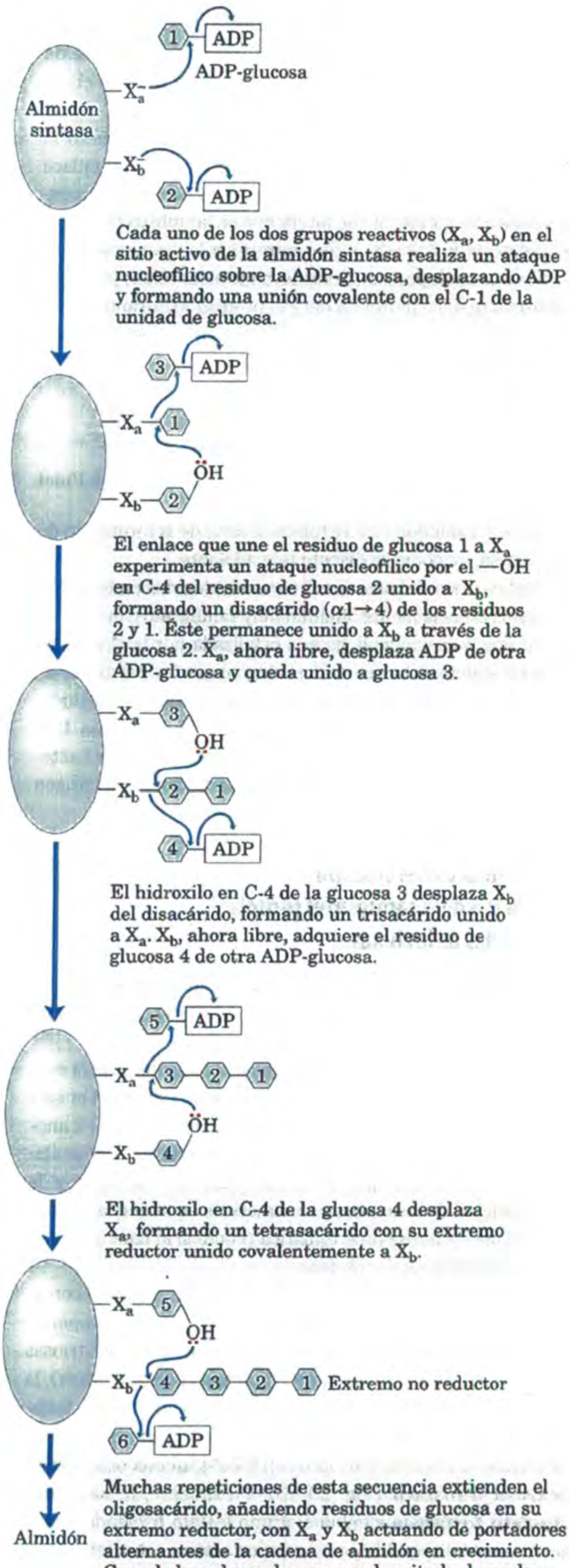


FIGURA 20–24 Síntesis del almidón. Según este modelo la síntesis del almidón transcurre mediante un mecanismo de inserción en dos sitios en el que la ADP-glucosa es el dador inicial de glucosilo. Los dos sitios activos idénticos en la almidón sintasa alternan en el desplazamiento mutuo de la cadena en crecimiento, mientras que las nuevas unidades glucosilo se insertan en el extremo reductor de la cadena en crecimiento.

La unión a un sitio activo activa de manera efectiva el extremo reductor de la cadena en crecimiento para el desplazamiento nucleofílico del enzima por el hidroxilo C-4 atacante de una porción glucosilo unida al otro sitio activo, formando el enlace (α1→4) característico del almidón.

La amilosa del almidón no tiene ramificaciones, pero la amilopectina tiene numerosas ramificaciones unidas en enlace (α1→6) (véase la Fig. 7–14). Los cloroplastos contienen un enzima ramificante similar al que interviene en la síntesis de glucógeno (véase la Fig. 15–31), que introduce las ramificaciones (α1→6) de la amilopectina. Considerando la hidrólisis por la pirofosfato inorgánico hidrolasa del PP_i producido durante la síntesis de ADP-glucosa, la reacción global para la formación de almidón a partir de glucosa 1-fosfato es

$$\text{Almidón}_n + \text{glucosa 1-fosfato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{almidón}_{n+1} + \text{ADP} + 2P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -50 \text{ kJ/mol}$$

La síntesis del almidón está regulada al nivel de la formación de ADP-glucosa, tal como se discute más adelante.

Muchos tipos de bacterias almacenan glúcidos en forma de glucógeno (esencialmente almidón muy ramificado), que sintetizan en una reacción análoga a la catalizada por la glucógeno sintasa en animales. Las bacterias, al igual que los plastidios de plantas, utilizan ADP-glucosa como forma activada de la glucosa, mientras que las células animales utilizan UDP-glucosa. Una vez más, la similitud entre el metabolismo de plastidios y bacterias está de acuerdo con la hipótesis endosimbiótica del origen de orgánulos (p. 33).

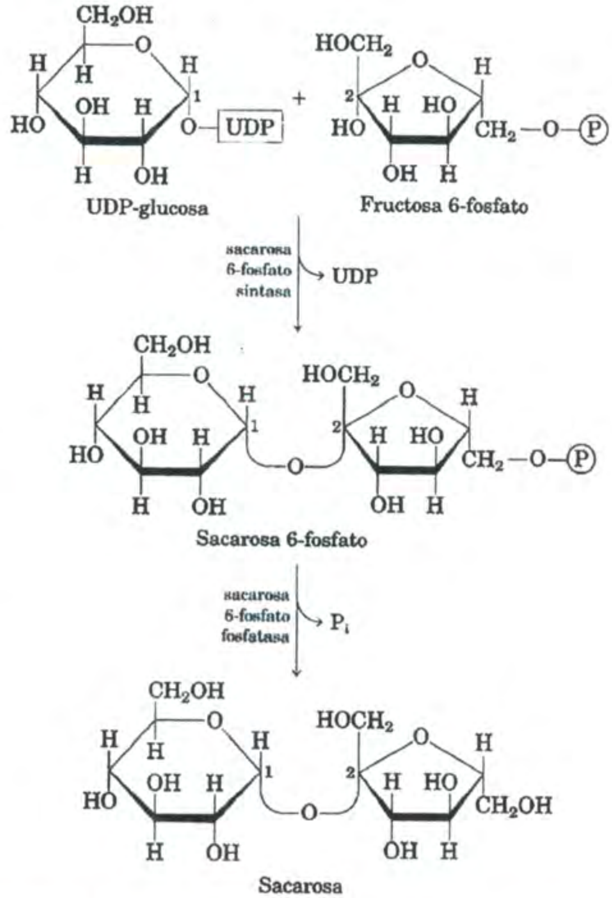


FIGURA 20–25 Síntesis de sacarosa. La sacarosa se sintetiza a partir de UDP-glucosa y fructosa 6-fosfato, que se sintetizan a partir de triosas fosfato en el citosol de la célula vegetal por las rutas mostradas en las Figuras 15–29 y 20–9. La sacarosa 6-fosfato sintasa de la mayor parte de especies vegetales está regulada alostéricamente por glucosa 6-fosfato y P_i.

La UDP-glucosa es el sustrato de la síntesis de sacarosa en el citosol de las células de las hojas

La mayor parte de las triosas fosfato generadas por fijación del CO_2 en las plantas se convierte en sacarosa **(Fig. 20–25)** o almidón.

La sacarosa puede haber sido seleccionada durante la evolución como forma de transporte del carbono debido al enlace poco habitual entre el C-1 anomérico de la glucosa y el C-2 anomérico de la fructosa. Este enlace no es hidrolizado por amilasas u otros enzimas que escinden glúcidos comunes, y la inaccesibilidad de los carbonos anoméricos evita que la sacarosa reaccione de forma no enzimática (como sí lo hace la glucosa) con aminoácidos y proteínas.

La sacarosa se sintetiza en el citosol, empezando con la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato exportados del cloroplasto. Después de la condensación de dos triosas fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato (catalizada por la aldolasa), la hidrólisis por la fructosa 1,6-bisfosfatasa forma fructosa 6-fosfato. La **sacarosa 6-fosfato sintasa** cataliza a continuación la reacción de la fructosa 6-fosfato con **UDP-glucosa** para formar **sacarosa 6-fosfato** (Fig. 20–25). Finalmente, la **sacarosa 6-fosfato fosfatasa** elimina el grupo fosfato haciendo que la sacarosa esté disponible para su exportación a otros tejidos. La reacción catalizada por la sacarosa 6-fosfato sintasa es un proceso de baja energía ($\Delta G'^{\circ} = -5{,}7$ kJ/mol) pero la hidrólisis de la sacarosa 6-fosfato a sacarosa es suficientemente exergónica ($\Delta G'^{\circ} = -16{,}5$ kJ/mol) para hacer que la síntesis global de la sacarosa sea esencialmente irreversible. Tal como veremos, la síntesis de sacarosa sea está regulada de forma muy coordinada con la síntesis de almidón.

Una diferencia notable entre las células de plantas y las de animales es la ausencia en el citosol de las células de plantas del enzima pirofosfato inorgánico hidrolasa, que cataliza la reacción

$$PP_i + H_2O \longrightarrow 2P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -19{,}2 \text{ kJ/mol}$$

Para muchas reacciones que liberan PP_i, la actividad pirofosfato inorgánico hidrolasa permite que el proceso sea energéticamente más favorable y que estas reacciones tengan cierta tendencia a ser irreversibles. En las plantas, este enzima se encuentra presente en los plastidios pero no en el citosol.

El resultado es que el citosol de las células de las hojas contengan una concentración sustancial de PP_i (~0,3 mM), suficiente para que reacciones tales como la catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa (véase la Fig. 15-29) sea fácilmente reversible. Recuerde del Capítulo 14 (p. 533) que el isozima citosólico de la fosfofructoquinasa en las plantas utiliza PP_i y no ATP como dador de fosforilo.

La conversión de triosas fosfato en sacarosa y almidón está fuertemente regulada

Las triosas fosfato producidas en el ciclo de Calvin con luz solar intensa pueden ser, como ya se ha dicho, temporalmente almacenadas en el cloroplasto en forma de almidón, o bien convertidas en sacarosa y exportadas a partes no fotosintéticas de la planta, o ambas cosas. El equilibrio entre estos dos procesos está fuertemente regulado y, además, también tienen que estar coordinados con la velocidad de fijación de carbono. Cinco sextas partes de las triosas fosfato abandona el en el ciclo de Calvin deben reciclarse a ribulosa 1,5-bisfosfato (Fig. 20–14); si más de una sexta parte de la triosa fosfato abandona el ciclo para formar sacarosa y almidón éste se hará más lento o incluso detendrá. Por otra parte, una conversión *insuficiente* de triosa fosfato en almidón o sacarosa secuestraría el fosfato, dejando al cloroplasto deficiente en P_i, el cual también es esencial para el ciclo de Calvin.

La fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) y el enzima que invierte efectivamente su acción, la fosfofructoquinasa dependiente de PP_i- (PP-PFK-1; p. 533), controlan el flujo de triosas fosfato hacia sacarosa. Estos enzimas son, por tanto, puntos críticos en la regulación del destino de las triosas fosfato producidas por la fotosíntesis. Ambos enzimas están regulados por la **fructosa-2,6-bisfosfato (F26BP),** que inhibe la FBPasa-1 y estimula la PP-PFK-1. En las plantas vasculares la concentración de F26BP varía inversamente con la velocidad de la fotosíntesis **(Fig. 20–26)**. La fosfofructoquinasa-2, responsable de la síntesis de F26BP, es inhibida por la dihidroxiacetona fosfato o el 3-fosfoglicerato, y estimulada por la fructosa 6-fosfato y el P_i. Durante la fotosíntesis activa se produce dihidroxiacetona fosfato y se consume P_i, lo que resulta en la inhibición de la PFK-2 y menores concentraciones de F26BP. Este hecho favorece un mayor flujo de triosa fosfato a fructosa 6-fosfato y la síntesis de sacarosa. Con este sistema regulador se da la síntesis de sacarosa cuando el nivel de triosa fosfato producido por el ciclo de Calvin supera las necesidades para mantener la operatividad del ciclo.

La síntesis de sacarosa está también regulada a nivel de la sacarosa 6-fosfato sintasa, que se activa alostéricamente por la glucosa 6-fosfato y es inhibida por el P_i. Este enzima es también regulado por fosforilación y desfosforilación; una proteína quinasa fosforila el enzima en un residuo Ser específico haciéndolo menos activo, mientras que una fosfatasa invierte esta inactivación por eliminación del fosfato **(Fig. 20–27)**. La inhibición de la quinasa por parte de la glucosa 6-fosfato y de la fosfatasa por P_i refuerzan los efectos de estos dos compuestos sobre la síntesis de sacarosa. Cuando las hexosas fosfato son abundantes, la sacarosa 6-fosfato sintasa es activada por la glucosa 6-fosfato; cuando la concentración de P_i es elevada (del mismo modo que cuando la fotosíntesis es lenta), disminuye la actividad de la sacarosa sintasa. Durante la fotosíntesis activa, las triosas fosfato se convierten en fructosa 6-fosfato, que se equilibra rápidamente con la glucosa 6-fosfato por la fosfohexosa isomerasa. Debido a que el equilibrio está muy desplazado hacia la glucosa 6-fosfato, tan pronto como se acumula la fructosa 6-fosfato el nivel de glucosa 6-fosfato aumenta, estimulándose de este modo la síntesis de sacarosa.

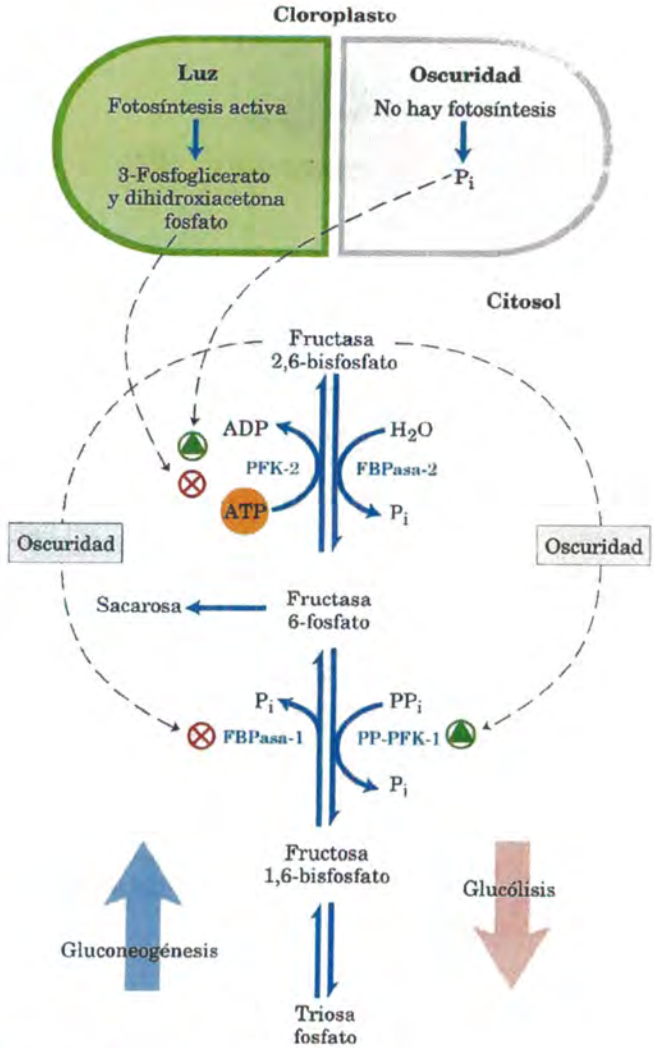


FIGURA 20–26 La fructosa 2,6-bisfosfato como regulador de la síntesis de sacarosa. La concentración del regulador alostérico fructosa 2,6-bisfosfato en las células vegetales está regulada por los productos de la asimilación fotosintética del carbono y por el P_i. La dihidroxiacetona fosfato y el 3-fosfoglicerato producidos por la asimilación del CO_2 inhiben la fosfofructoquinasa-2 (PFK-2), enzima que sintetiza el regulador; el P_i estimula la PFK-2. Por consiguiente, la concentración del regulador es inversamente proporcional a la tasa de fotosíntesis. En la oscuridad, la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato aumenta, con lo que estimula el enzima glucolítico fosfofructoquinasa-1 dependiente de PP_i (PP-PFK-1) al tiempo que inhibe el enzima gluconeogénico fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1). Cuando la fotosíntesis es activa (en la luz), la concentración del regulador desciende favoreciendo de este modo la síntesis de fructosa 6-fosfato y de sacarosa.

El enzima regulador clave en la síntesis de almidón es la **ADP-glucosa pirofosforilasa (Fig. 20–28)**, que es activada por el 3-fosfoglicerato (que se acumula durante la fotosíntesis activa) e inhibida por el P_i (que se acumula cuando la condensación de ADP y P_i impulsada por la luz se enlentece). Cuando disminuye la velocidad de síntesis de la sacarosa el 3-fosfoglicerato formado por la fijación de CO_2 se acumula, activando este enzima y estimulando la síntesis de almidón.

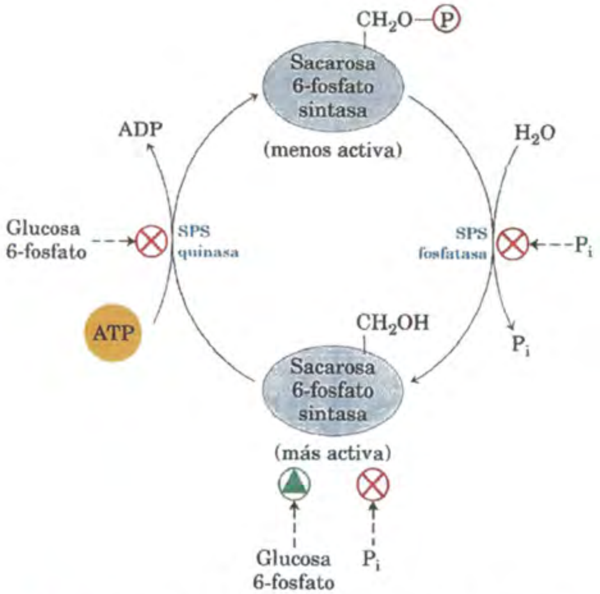


FIGURA 20–27 Regulación de la sacarosa fosfato sintasa por fosforilación. Una proteína quinasa (SPS quinasa) específica de la sacarosa fosfato sintasa (SPS) fosforila un residuo Ser de la SPS, inactivándola; una fosfatasa específica (SPS fosfatasa) invierte esta inhibición. La quinasa es inhibida alostéricamente por la glucosa 6-fosfato, que también activa alostéricamente la SPS. La fosfatasa es inhibida por P_i, que también inhibe directamente la SPS. Así, cuando la concentración de glucosa 6-fosfato es elevada como resultado de una fotosíntesis activa, se activa la SPS, produciendo sacarosa fosfato. Una concentración de P_i elevada, lo que sucede cuando la conversión fotosintética de ADP en ATP es lenta, inhibe la síntesis de sacarosa fosfato.

FIGURA 20–28 Regulación de la ADP-glucosa fosforilasa por el 3-fosfoglicerato y el P_i. Este enzima, que produce el precursor para la síntesis del almidón, es limitante de velocidad en la producción de almidón. El enzima es estimulado alostéricamente por el 3-fosfoglicerato (3-PGA) e inhibido por el P_i; en efecto, la razón [3-PGA]/[P_i], que aumenta cuando aumenta la velocidad de fotosíntesis, controla la síntesis de almidón en este paso.

RESUMEN 20.3 Biosíntesis del almidón y la sacarosa

- La almidón sintasa de los cloroplastos y amiloplastos cataliza la adición de residuos de glucosa, donados por la ADP-glucosa, al extremo reductor de una molécula de almidón mediante un mecanismo de inserción en dos pasos. Un segundo enzima introduce las ramas de la amilopectina.
- La sacarosa se sintetiza en el citosol en dos pasos a partir de UDP-glucosa y fructosa 1-fosfato.
- La distribución de las triosas fosfato entre la síntesis de sacarosa y la síntesis de almidón está regulada por la fructosa 2,6-bisfosfato (F26BP), un efector alostérico de los enzimas que determinan el nivel de fructosa 6-fosfato. La concentración de F26BP varía inversamente con la velocidad de fotosíntesis y el F26BP inhibe la síntesis de fructosa 6-fosfato, el precursor de la sacarosa.

20.4 Síntesis de polisacáridos de la pared celular: celulosa vegetal y peptidoglucano bacteriano

La celulosa es un constituyente mayoritario de las paredes celulares de las plantas que proporciona fuerza y rigidez e impide el hinchamiento de la célula y la rotura de la membrana plasmática que se podría producir cuando las condiciones osmóticas favorecen la entrada de agua en la célula. Cada año en todo el mundo las plantas sintetizan más de 10^{11} toneladas de celulosa, lo que hace que este polímero sea uno de los compuestos más abundante de la biosfera. Su estructura es sencilla: polímeros lineales de miles de unidades de D-glucosa unidas en enlace ($\beta 1 \rightarrow 4$), formando haces de unas 36 cadenas, que se agregan lateralmente para formar una microfibrilla **(Fig. 20–29)**.

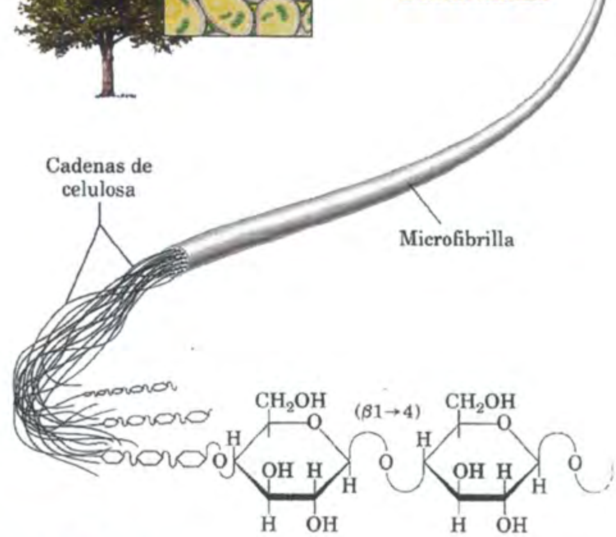


FIGURA 20–29 Estructura de la celulosa. La pared celular de las plantas está formada en parte por moléculas de celulosa dispuestas una al lado de la otra formando ordenamientos paracristalinos: las microfibrillas de celulosa. Muchas microfibrillas se combinan formando una fibra de celulosa que se ve al microscopio electrónico de barrido como una estructura de 5 a 12 nm de diámetro, depositada sobre la superficie celular en varias capas que se distinguen por las diferentes orientaciones de sus fibras.

La biosíntesis de celulosa es menos bien conocida que la del glucógeno o el almidón. Como uno de los componentes principales de la pared celular de las plantas, la celulosa se tiene que sintetizar a partir de precursores intracelulares pero se tiene que depositar y formar su estructura fuera de la membrana plasmática. La maquinaria enzimática para el inicio, alargamiento y exportación de las cadenas de celulosa es más complicada que la necesaria para sintetizar almidón o glucógeno (que no se exportan). Las bacterias han de afrontar un conjunto de problemas similar cuando sintetizan los polisacáridos complejos que forman sus paredes celulares y puede que utilicen algunos mecanismos idénticos para resolver estos problemas.

La celulosa se sintetiza por estructuras supramoleculares en la membrana plasmática

La compleja maquinaria enzimática que ensambla las cadenas de celulosa abarca la membrana plasmática con una parte posicionada para unir el sustrato, la UDP-glucosa, en el citosol y la otra parte extendiéndose hacia el exterior y que es responsable del alargamiento y cristalización de las moléculas de celulosa en el espacio extracelular. La microscopia electrónica por criofractura muestra que estos **complejos terminales** también llamados **rosetas** están compuestos por seis grandes partículas dispuestas en un hexágono regular con un diámetro de unos 30 nm **(Fig. 20–30)**. El complejo terminal está formado por varias proteínas, entre ellas la subunidad catalítica de la **celulosa sintasa.** Gran parte de los progresos recientes en el conocimiento de la síntesis de la celulosa provienen de los estudios genéticos y de genética molecular de la planta *Arabidopsis thaliana*, que es especialmente asequible a la disección genética y cuyo genoma ya ha sido secuenciado. La familia génica que codifica esta actividad de síntesis de la celulosa se ha clonado, habiéndose encontrado que codifica proteínas con ocho segmentos transmembrana y un dominio central en el lado citosólico de la membrana plasmática que incluye secuencias propias de una glucosiltransferasa (Fig. 20–30).

En uno de los modelos de síntesis de celulosa, las cadenas de celulosa se inician con la formación de un intermediario unido a lípido diferente de todo cuanto interviene en la síntesis del almidón o del glucógeno. Tal como se muestra en el paso ① de la Figura 20–30, la glucosa se transfiere desde la UDP-glucosa a un lípido de membrana, probablemente el esterol vegetal sitosterol en la cara interior de la membrana plasmática. Aquí, la celulosa sintasa intracelular añade varios residuos adicionales de glucosa al primero, en unión ($\beta 1 \rightarrow 4$), formando una cadena oligosacárida corta unida al sitosterol (sitosterol dextrina). A continuación, toda la sitosterol dextrina da la vuelta hacia la cara exterior de la membrana plasmática, en donde se asocia con otra forma de celulosa sintasa.

② La UDP-glucosa utilizada para la síntesis de celulosa se genera a partir de la sacarosa producida durante la fotosíntesis, en la reacción catalizada por la sacarosa sintasa (nombrada según la reacción inversa):

$$\text{Sacarosa} + \text{UDP} \longrightarrow \text{UDP-glucosa} + \text{fructosa}$$

La celulosa sintasa abarca la membrana plasmática y utiliza UDP-glucosa citosólica como precursor para la síntesis extracelular de celulosa. Una forma de sacarosa sintasa unida a la membrana forma un complejo con la celulosa sintasa, proporcionando UDP-glucosa a partir de la sacarosa directamente a la síntesis de la pared celular.

③ Una segunda forma de celulosa sintasa alarga el polímero en 500 a 15.000 unidades de glucosa, expulsándolo hacia superficie exterior de la célula. La acción del enzima es procesiva: una molécula de enzima añade muchas moléculas de glucosa

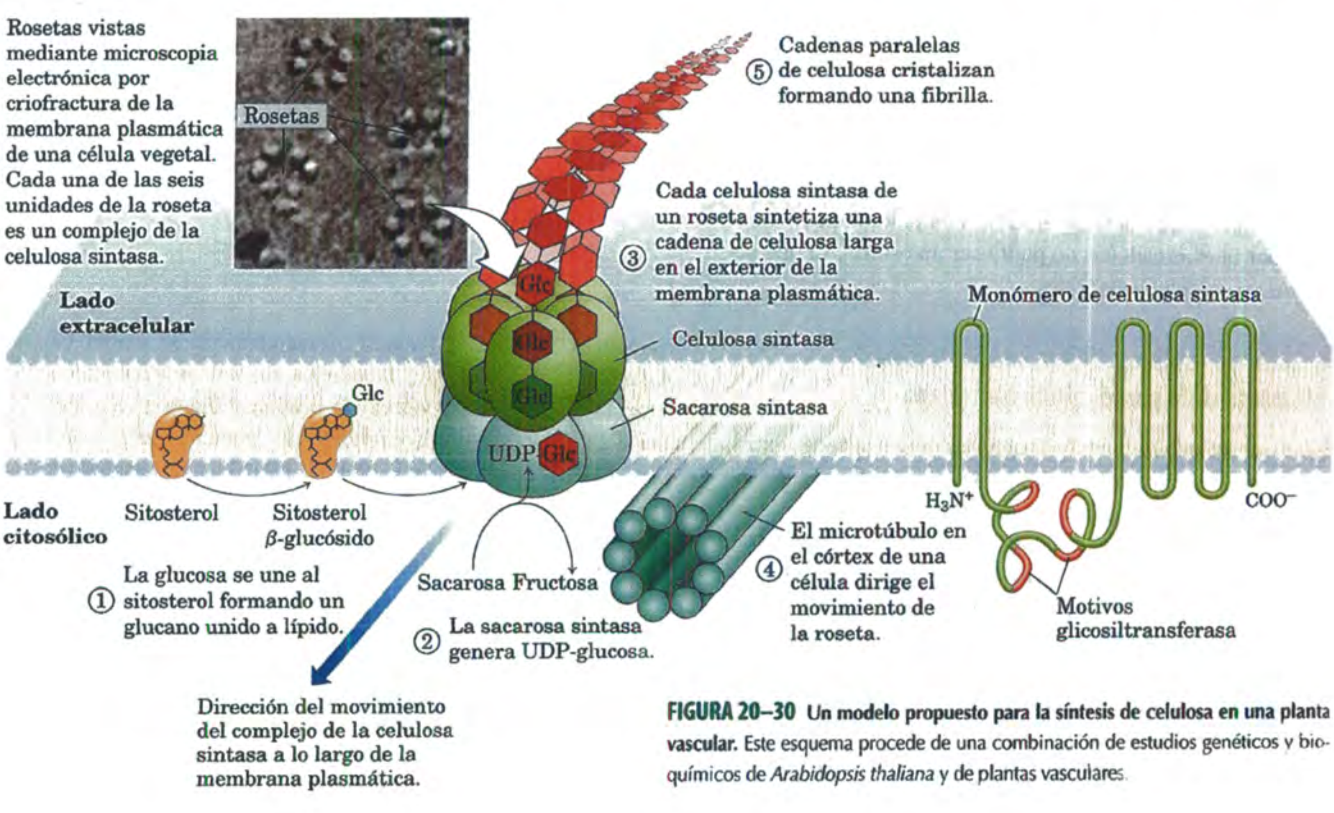


FIGURA 20–30 Un modelo propuesto para la síntesis de celulosa en una planta vascular. Este esquema procede de una combinación de estudios genéticos y bioquímicos de *Arabidopsis thaliana* y de plantas vasculares.

antes de abandonar la cadena creciente de celulosa. No se ha establecido la dirección del crecimiento de la cadena (es decir, si la adición tiene lugar en el extremo reductor o bien en el no reductor).

Cada uno de los seis glóbulos de la roseta consiste en múltiples subunidades proteicas que, en conjunto, sintetizan seis cadenas de celulosa. (4) De hecho, el gran complejo enzimático que cataliza este proceso se traslada a lo largo de la membrana plasmática, siguiendo el curso de los microtúbulos en el córtex, la capa citoplasmática que se encuentra inmediatamente debajo de la membrana. Debido a que estos microtúbulos son perpendiculares al eje de crecimiento de la planta, las microfibrillas de celulosa se disponen a través del eje de crecimiento. Se cree que el movimiento de los complejos de celulosa sintasa está impulsado por energía liberada en la reacción de polimerización y no por un motor molecular tal como la quinesina.

La celulosa acabada se encuentra en la forma de microfibrillas cristalinas (Fig. 20–29), formada cada una de ellas por 36 cadenas separadas de celulosa que se encuentran una al lado de otra, todas ellas con la misma orientación (paralelas) de extremos reductores y no reductores. Parece probable que los 36 polímeros separados sintetizados en una roseta lleguen conjuntamente a la superficie exterior de la célula ya alineados y (5) preparados para cristalizar en forma de microfibrilla de la pared celular. Cuando los 36 polímeros alcanzan una longitud crítica, se termina su síntesis por un mecanismo desconocido, a lo que sigue la cristalización en forma de microfibrilla.

En el precursor activado de la celulosa (UDP-glucosa), la glucosa está unida al nucleótido a través de una unión α, pero en el producto (celulosa) los residuos de glucosa están unidos por enlace (β1→4), por lo que hay una inversión de configuración en el carbono anomérico (C-1) cuando se forma el enlace glucosídico. Por lo general, se supone que las glucosiltransferasas que invierten la configuración utilizan un mecanismo de desplazamiento sencillo, con ataque nucleofílico por la especie aceptora en el carbono anomérico del azúcar dador (UDP-glucosa).

Algunas bacterias (*Acetobacter, Agrobacteria, Rhizobia* y *Sarcina*) y muchos eucariotas sencillos también sintetizan celulosa, aparentemente por medio de un mecanismo similar al de las plantas. Si las bacterias utilizan un lípido de membrana para iniciar nuevas cadenas no podrá ser un esterol, ya que las bacterias no contienen esteroles.

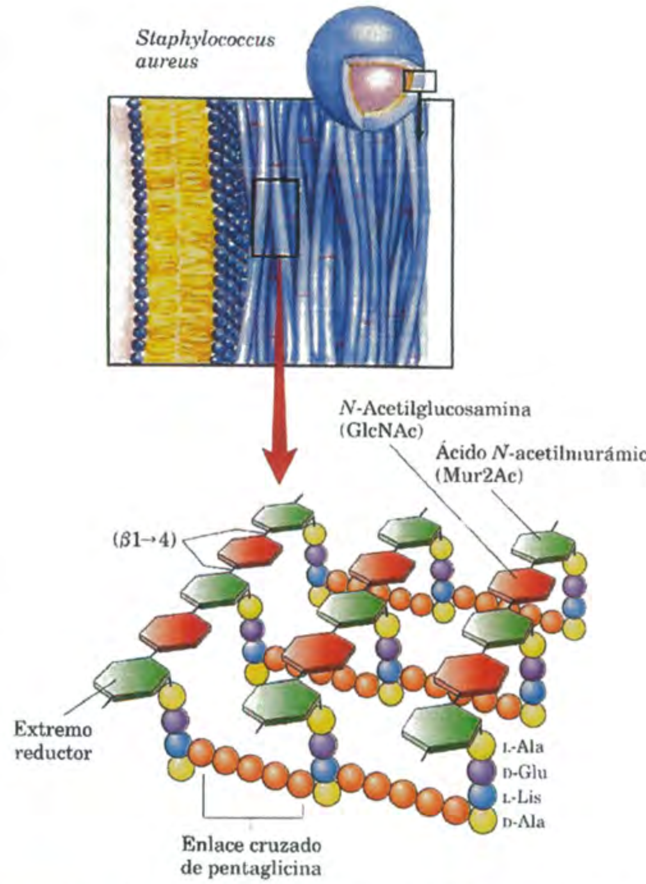
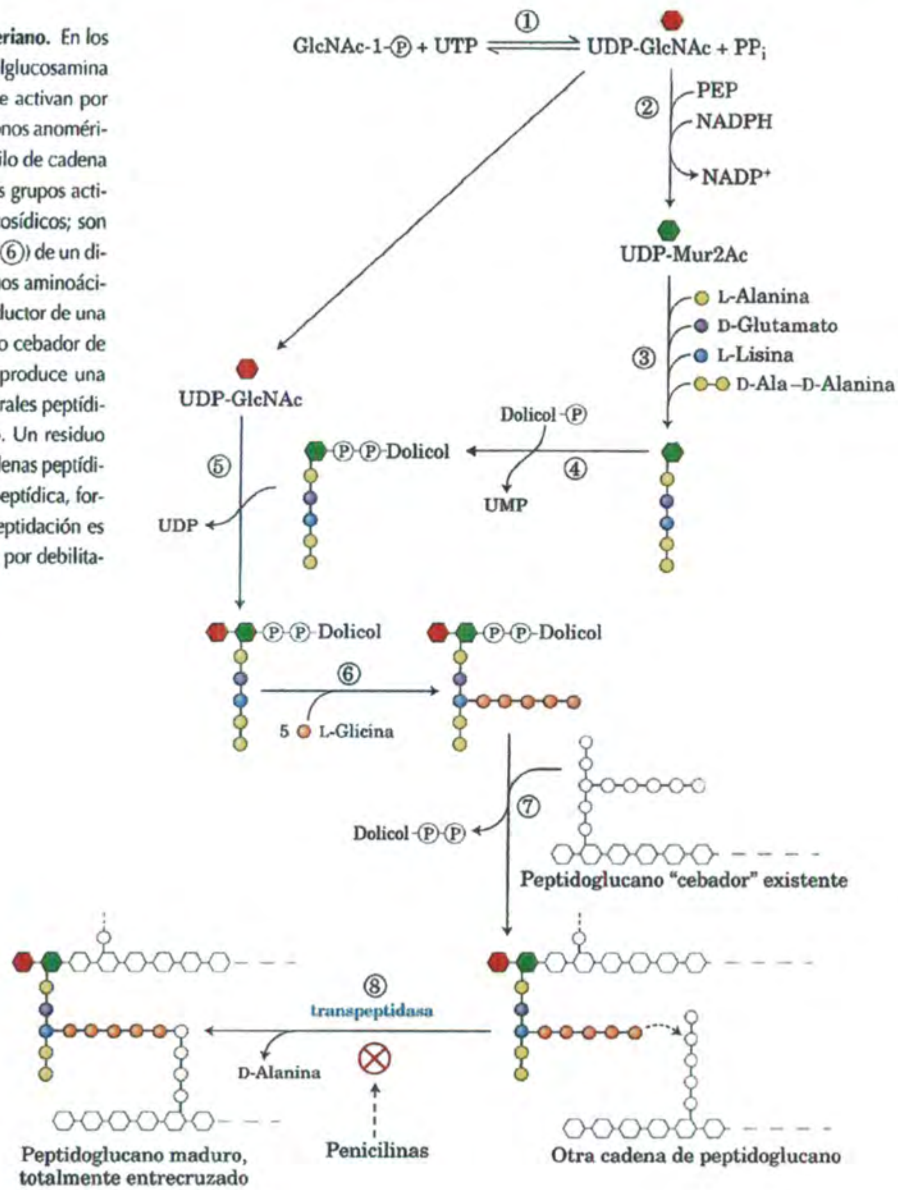


FIGURA 20–31 Estructura del peptidoglucano Éste es el peptidoglucano de la pared celular de la bacteria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Los péptidos (ristras de esferas coloreadas) unen covalentemente residuos de ácido *N*-acetilmurámico de las cadenas de polisacáridos vecinas. Observe la mezcla de aminoácidos L y D en los péptidos. Las bacterias gram-positivas tales como *S. aureus* tienen una cadena de pentaglicina en el entrecruzamiento. Las bacterias gram-negativas como por ejemplo *E. coli* carecen de pentaglicina; en cambio, el residuo terminal de D-Ala de un tetrapéptido está unido directamente al tetrapéptido vecino a través de una L-Lys o de un aminoácido tipo lisina, el ácido diaminopimélico. El enlace peptídico del glutamato no es aquí el usual; interviene el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato.

Oligosacáridos unidos a lípidos son precursores en la síntesis de la pared celular bacteriana

Al igual que las plantas, muchas bacterias tienen paredes extracelulares rígidas y gruesas que las protegen de la lisis osmótica. El **peptidoglucano** que da a las cubiertas bacterianas su fuerza y rigidez es un copolímero lineal que alterna *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (Mur2Ac), unidos por enlaces glucosídicos (β1→4) y entrecruzados por péptidos cortos unidos al Mur2Ac **(Fig. 20–31)**. Durante el ensamblaje del armazón de polisacárido de esta macromolécula compleja, tanto la GlcNAc como el Mur2Ac se activan por la unión de un nucleótido de uridina a sus carbonos anoméricos. Primero la GlcNAc 1-fosfato se condensa con el UTP dando UDP-GlcNAc (**Fig. 20–32**, paso (1)), que reacciona con el fosfoenolpiruvato para dar UDP-Mur2Ac (paso (2)); seguidamente se añaden cinco aminoácidos (paso (3)). La porción Mur2Ac-pentapéptido se transfiere desde el nucleótido de uridina al lípido de membrana dolicol, un alcohol isoprenoide de cadena larga (véase la Fig. 10–22f) (paso (4)), y la UDP-GlcNAc dona un residuo GlcNAc (paso (5)). En muchas bacterias se añaden cinco glicinas en enlace peptídico al grupo amino del residuo Lys del pentapéptido (paso (6)). Finalmente, este disacárido decapéptido se añade al extremo no reductor de una molécula de peptidoglucano existente (paso (7)). Una reacción de transpeptidación entrecruza cadenas de polisacárido adyacentes (paso (8)), contribuyendo a la enorme y fuerte pared macromolecular alrededor de la célula bacteriana. Muchos de los antibióticos más efectivos que se utilizan hoy en día actúan inhibiendo reacciones de la síntesis del peptidoglucano.

FIGURA 20–32 Síntesis del peptidoglucano bacteriano. En los pasos iniciales de esta ruta (de ① a ④), la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y el ácido *N*-acetilmurámico (Mur2Ac) se activan por unión de un nucleótido de uridina (UDP) a sus carbonos anoméricos y, en el caso del Mur2Ac, de un alcohol isoprenilo de cadena larga (dolicol) mediante un enlace fosfodiéster. Estos grupos activadores participan en la formación de enlaces glucosídicos; son excelentes grupos salientes. Tras el ensamblaje (⑤y⑥) de un disacárido con una cadena lateral peptídica (10 residuos aminoácidos), ⑦este precursor se transfiere al extremo no reductor de una cadena de peptidoglucano existente, que sirve como cebador de la reacción de polimerización. Finalmente, ⑧ se produce una reacción de transpeptidación entre las cadenas laterales peptídicas de dos moléculas diferentes de peptidoglucano. Un residuo Gly que se encuentra en el extremo de una de las cadenas peptídicas desplaza una D-Ala terminal de la otra cadena peptídica, formando una unión cruzada. Esta reacción de transpeptidación es inhibida por las penicilinas, que matan las bacterias por debilitación de sus paredes celulares (véase la Fig. 6–27).



Muchos otros oligosacáridos y polisacáridos se sintetizan a través de rutas similares en las que los azúcares se activan para las reacciones siguientes por la unión de nucleótidos. En la glucosilación de proteínas, por ejemplo (véase la Fig. 27-39), los precursores de la parte glucídica son nucleótidos-azúcar y oligosacáridos unidos a lípido.

RESUMEN 20.4 Síntesis de polisacáridos de la pared celular: celulosa vegetal y peptidoglucano bacteriano

- La síntesis de celulosa tiene lugar en complejos terminales (rosetas) de la membrana plasmática. Cada cadena de celulosa empieza en forma de una sitosterol dextrina formada en el interior de la célula. A continuación gira hacia el exterior, en donde la porción oligosacárida se transfiere a la celulosa sintasa en la roseta y entonces se produce la elongación. Cada roseta produce 36 cadenas separadas de celulosa de forma simultánea y en paralelo. Las cadenas cristalizan en una de las microfibrillas que forman la pared celular.
- En la síntesis del peptidoglucano de la pared celular bacteriana también intervienen oligosacáridos unidos a lípido formados dentro de la célula y girados hacia el exterior para su ensamblado.

20.5 Integración del metabolismo glucídico en la célula vegetal

En ciertos aspectos el metabolismo glucídico en una célula vegetal típica es más complejo que el de una célula animal típica. La célula vegetal lleva a cabo los mismos procesos que generan energía en las células animales (glucólisis, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa); puede generar hexosas a partir de compuestos de tres o cuatro carbonos por gluconeogénesis; puede oxidar hexosas fosfato a pentosas fosfato con generación de NADPH (ruta oxidativa de las pentosas fosfato), y pue-

de producir un polímero de glucosa con uniones (α1→4) (almidón) y degradarlo para generar hexosas. Pero aparte de estas transformaciones de glúcidos que comparte con las células animales, la célula vegetal fotosintética puede fijar CO_2 dando compuestos orgánicos (reacción de la rubisco); utiliza los productos de la fijación para generar triosas, hexosas y pentosas (ciclo de Calvin), y convierte el acetil-CoA generado en la degradación de ácidos grasos en compuestos de cuatro carbonos (ciclo del glioxilato) y los compuestos de cuatro carbonos en hexosas (gluconeogénesis). Estos procesos, específicos de las células vegetales, están segregados en diversos compartimientos que no se encuentran en las células animales: el ciclo del glioxilato en los glioxisomas, el ciclo de Calvin en los cloroplastos, la síntesis de almidón en los amiloplastos y el almacenamiento de ácidos orgánicos en las vacuolas. La integración de acontecimientos entre estos compartimientos diversos requiere transportadores específicos en las membranas de cada orgánulo para transportar productos desde un orgánulo a otro o al citosol.

La gluconeogénesis convierte grasas y proteínas en glucosa en las semillas en germinación

Muchas plantas almacenan lípidos y proteínas en sus semillas para utilizarlos como fuente de energía y como precursores biosintéticos durante la germinación, antes de que se hayan desarrollado los mecanismos fotosintéticos. En las semillas en germinación tiene lugar una gluconeogénesis activa que proporciona la glucosa para la síntesis de sacarosa, polisacáridos y muchos metabolitos procedentes de hexosas. En las plántulas que están emergiendo de las semillas la sacarosa proporciona gran parte de la energía química necesaria para el crecimiento inicial.

Anteriormente ya se dijo (Capítulo 14) que las células animales pueden realizar la gluconeogénesis a partir de precursores de tres y cuatro carbonos, pero no de los dos carbonos acetílicos del acetil-CoA. Debido a que la reacción de la piruvato deshidrogenasa es efectivamente irreversible (pp. 616-617), las células animales no tienen forma de convertir el acetil-CoA en piruvato u oxalacetato. A diferencia de los animales, las plantas y algunos microorganismos *pueden* convertir el acetil-CoA formado durante la oxidación de los ácidos grasos en glucosa (**Figura 20–33**). Algunos de los enzimas esenciales para esta conversión se encuentran en glioxisomas, en donde los isozimas de la β-oxidación específicos del glioxisona degradan los ácidos grasos a acetil-CoA (véase la Fig. 16–22). La separación física de los enzimas de este ciclo del glioxilato y los de la β-oxidación con los enzimas del ciclo del ácido cítrico mitocondrial impide la oxidación posterior del acetil-CoA a CO_2. En su lugar el acetil-CoA se convierte en succinato en el ciclo del glioxilato (véase la Fig. 16–20). El succinato pasa a la matriz mitocondrial en donde se convierte, por enzimas del ciclo del ácido cítrico, en oxalacetato que sale hacia el citosol. El oxalacetato citosólico se convierte por la gluconeogénesis en fructosa 6-fosfato, que es el precursor de la sacarosa. Así, se requiere la integración de secuencias de reacción que transcurren en tres compartimientos subcelulares para la producción de fructosa 6-fosfato o sacarosa a partir de lípidos almacenados. Debido a que sólo tres de los cuatro carbonos de cada molécula de oxalacetato se convierten en hexosa en el citosol, alrededor del 75% del carbono de los ácidos grasos almacenados como lípidos de las semillas se convierten en glúcidos por las rutas combinadas de la Figura 20–33. El 25% restante se pierde en forma de CO_2 en la conversión del

FIGURA 20–33 Conversión de ácidos grasos almacenados en sacarosa en semillas en germinación. Esta ruta empieza en los glioxisomas. Se produce succinato que se exporta a la mitocondria, en donde se convierte en oxalacetato por enzimas del ciclo del ácido cítrico. El oxalacetato entra en el citosol y sirve de material de partida para la gluconeogénesis y para la síntesis de sacarosa, la forma de transporte del carbono en las plantas.

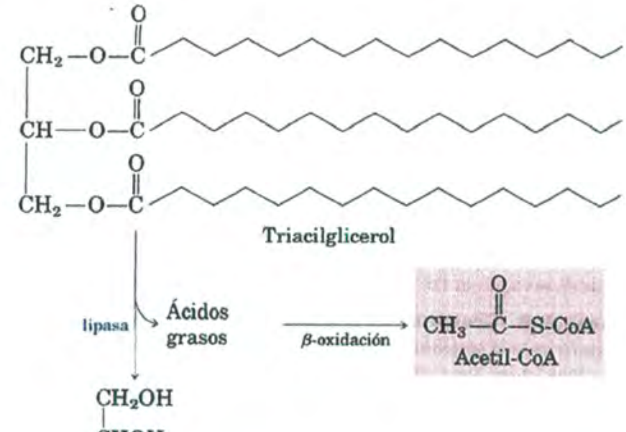


FIGURA 20–34 Conversión de la porción glicerol de los triacilgliceroles en sacarosa en las semillas en germinación. El glicerol de los triacilgliceroles se oxida a dihidroxiacetona fosfato, que entra en la ruta gluconeogénica mediante la reacción de la triosa fosfato isomerasa.

oxalacetato en fosfoenolpiruvato. La hidrólisis de los triacilgliceroles de reserva también produce glicerol 3-fosfato, que puede entrar en la ruta gluconeogénica después de su oxidación a dihidroxiacetona fosfato **(Fig. 20–34)**.

Los aminoácidos glucogénicos (véase la Tabla 14–4) procedentes de la degradación de proteínas almacenadas en las semillas también producen precursores de la gluconeogénesis. Se transaminan y oxidan a succinil-CoA, piruvato, oxalacetato, fumarato y α-cetoglutarato (Capítulo 18), todos ellos buenos materiales de partida para la gluconeogénesis.

Fondos o reservas (pools) de intermediarios comunes unen rutas en diferentes orgánulos

Aunque hemos descrito transformaciones metabólicas en células vegetales en términos de rutas individuales, estas rutas están tan interconectadas que en su lugar tendríamos que considerar fondos o reservas (pools) de intermediarios metabólicos compartidos entre estas rutas y conectados por reacciones fácilmente reversibles **(Fig. 20–35)**. Uno de estos **fondos de metabolitos** incluye las hexosas fosfato glucosa 1-fosfato, glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato; un segundo fondo incluye los 5-fosfato de las pentosas ribosa, ribulosa y xilulosa; un tercero incluye las triosas fosfato dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. El flujo de metabolitos a través de estos fondos cambia en magnitud y dirección como respuesta a cambios en las circunstancias de la planta, variando también según el tipo de tejido. Los transportadores de la membrana de cada orgánulo transportan compuestos específicos hacia dentro y hacia fuera, y la regulación de estos transportadores probablemente influye en el grado con que se mezclan estos fondos.

Durante las horas diurnas, las triosas fosfato producidas en el tejido de las hojas por el ciclo de Calvin salen del cloroplasto y van a la reserva o fondo de hexosas fosfato citosólicas, donde se convierten en sacarosa para su transporte a tejidos no fotosintéticos. En estos tejidos la sacarosa se convierte en almidón para su almacenamiento o se utiliza como fuente de energía a

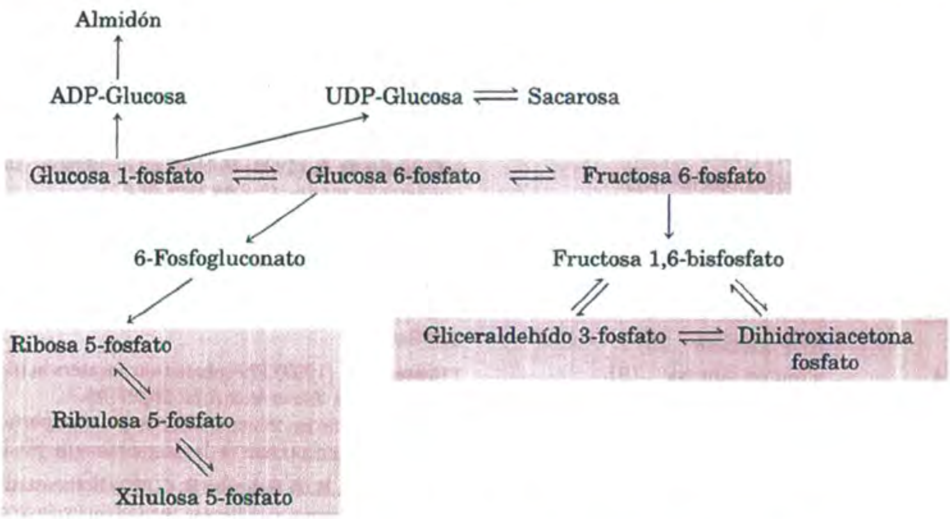


FIGURA 20–35 Fondos (pools) de hexosas fosfato, pentosas fosfato y triosas fosfato. Los compuestos de cada fondo son fácilmente interconvertibles mediante reacciones con variaciones de energía libre estándar pequeñas. Cuando uno de los componentes del fondo está agotado temporalmente, se establece rápidamente un nuevo equilibrio para rellenarlo. El movimiento de los azúcares fosfato entre compartimientos intracelulares es limitado; han de existir transportadores específicos en la membrana de un orgánulo.

través de la glucólisis. En las plantas en crecimiento, las hexosas fosfato también son retiradas del fondo para ser utilizadas en la síntesis de las paredes celulares. Durante la noche, el almidón se metaboliza a través de la glucólisis para proporcionar energía, esencialmente de la misma manera que en los organismos no fotosintéticos, y se obtienen NADPH y ribosa 5-fosfato a través de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato.

RESUMEN 20.5 Integración del metabolismo glucídico en la célula vegetal

- Las plantas pueden sintetizar azúcares a partir del acetil-CoA, producto de la degradación de los ácidos grasos por la acción combinada del ciclo del glioxilato y de la gluconeogénesis.
- Las rutas individuales del metabolismo glucídico que se dan en las plantas presentan extensos solapamientos; comparten fondos de intermediarios comunes, entre ellos hexosas fosfato, pentosas fosfato y triosas fosfato. Los transportadores que se encuentran en las membranas de los cloroplastos, mitocondrias y amiloplastos facilitan el movimiento de los azúcares fosfato entre los orgánulos. La dirección del flujo de metabolitos cambia del día a la noche.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

Bibliografía

Referencias generales

Blankenship, R.E. (2002) *Molecular Mechanisms of Photo-synthesis*, Blackwell Science, Oxford.

Tratado de nivel intermedio fácil de lectura y bien ilustrado sobre todos los aspectos de la fotosíntesis, incluido el metabolismo del carbono cubierto en este capítulo y las reacciones impulsadas por la luz descritas en el Capítulo 19.

Buchanan, B.B., Gruissem, W., & Jones, R.L. (eds). (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiology, Rockville, MD.

Este libro maravilloso, puesto al día y prestigioso, cubre todos los aspectos de la bioquímica y la biología molecular de plantas. Los siguientes capítulos cubren la síntesis de glúcidos en mayor profundidad: **Malkin, R. & Niyogi, K.**, Capítulo 12, Photosynthesis (pp. 568–629); **Dennis, D.T. & Blakeley, S.D.**, Capítulo 13, Carbohydrate Metabolism (pp. 630–675); **Siedow, J.N. & Day, D.A.**, Capítulo 14, Respiration and Photorespiration (pp. 676–729).

Carpita, N. & McCann, M. (2002) The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R., eds), pp. 52–108, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Heldt, H.-W. (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, Oxford.

Otro libro de texto excelente sobre bioquímica de plantas. Especialmente útiles son el Capítulo 6, Asimilación fotosintética del CO_2 por el ciclo de Calvin; el Capítulo 7, Fotorrespiración, y el Capítulo 9, Polisacáridos.

Síntesis fotosintética de glúcidos

Anderson, L.E., Gatla, N., & Caro, A.A. (2005) Enzyme co-localization in pea leaf chloroplasts: glyceraldehyde-3-P dehydrogenase, triose-P isomerase, aldolase and sedoheptulose bisphosphatase. *Photosynth. Res.* **83**, 317–328.

Andersson, I., Knight, S., Schneider, G., Lindqvist, Y., Lundqvist, T., Brändén, C.-I., & Lorimer, G.H. (1989) Crystal structure of the active site of ribulose-bisphosphate carboxylase. *Nature* **337**, 229–234.

Bassham, J.A. (2003) Mapping the carbon reduction cycle: a personal retrospective. *Photosynth. Res.* **76**, 35–52.

Benson, A.A. (2002) Following the path of carbon in photosynthesis: a personal story—history of photosynthesis. *Photosynth. Res.* **73**, 31–49.

Calvin, M. (1989) Forty years of photosynthesis and related activities. *Photosynth. Res.* **21**, 3–16.

Cleland, W.W., Andrews, T.J., Gutteridge, S., Hartman, F.C., & Lorimer, G.H. (1998) Mechanism of rubisco—the carbamate as general base. *Chem. Rev.* **98**, 549–561.

Revisión centrada especialmente en el carbamato del sitio activo.

Dietz, K.J., Link, G., Pistorius, E.K., & Scheibe, R. (2002) Redox regulation in oxygenic photosynthesis. *Prog. Botany* **63**, 207–245.

Flügge, U.-I. (1999) Phosphate translocaters in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 27–45.

Revisión de los transportadores que transportan P_i y diversos azúcares fosfato a través de las membranas de plastidios.

Fridlyand, L.E. & Scheibe R. (1999) Homeostatic regulation upon changes of enzyme activities in the Calvin cycle as an example for general mechanisms of flux control: what can we expect from transgenic plants? *Photosynth. Res.* **61**, 227–239.

Gontero, B., Cardenas, M.L., & Ricard, J. (1988) A functional five-enzyme complex of chloroplasts involved in the Calvin cycle. *Eur. J. Biochem.* **173**, 437–443.

Hartman, F.C. & Harpel, M.R. (1994) Structure, function, regulation and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 197–234.

Horecker, B.L. (2002) The pentose phosphate pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 47,965–47,971.

Portis, A.R., Jr. (2003) Rubisco activase: rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth. Res.* **75**, 11–27.

Estructura, regulación, mecanismo e importancia de la rubisco activasa.

Portis, A.R., Jr. & Parry, M.A.J. (2007) Discoveries in rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynth. Res.* **94**, 121–143.

Raven, J.A. & Girard-Bascou, J. (2001) Algal model systems and the elucidation of photosynthetic metabolism. *J. Phycol.* **37**, 943–950.

Breve revisión de nivel intermedio.

Schneider, G., Lindqvist, Y., Brändén, C.-I., & Lorimer, G. (1986) Three-dimensional structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum* at 2.9 Å resolution. *EMBO J.* **5**, 3409–3415.

Smith, A.M., Denyer, K., & Martin, C. (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 67–87.

Revisión sobre el papel de la ADP-glucosa pirofosforilasa en la síntesis de amilosa y amilopectina en los gránulos de almidón.

Spreitzer, R.J. & Salvucci, M.E. (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 449–475.

Revisión avanzada sobre la rubisco y la rubisco activasa.

Stitt, M. (1995) Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 341–368.

Revisión de los métodos genéticos para definir puntos de regulación in vivo.

Tabita, F.R. (1999) Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a different perspective. *Photosynth. Res.* **60**, 1–28.

Discusión sobre estudios bioquímicos y genéticos de la rubisco microbiana y su comparación con el enzima de plantas.

Winkel, B.S.J. (2004) Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 85–107.

Wolosiuk, R., Ballicora, M., & Hagelin, K. (1993) The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO_2 assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.* **7**, 622–637.

Fotorrespiración y rutas C_4 y CAM

Ainsworth, E.A. & Long, S.P. (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO_2 enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the response of photosynthesis, canopy properties, and plant production to rising CO_2. *New Phytol.* **165**, 351–372.

Black, C.C. & Osmond, C.B. (2003) Crassulacean acid metabolism and photosynthesis: working the night shift. *Photosynth. Res.* **76**, 329–341.

Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M., & Rébeillé, F. (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci.* **6**, 167–176.

Descripción de nivel intermedio de la estructura y mecanismo de reacción del enzima.

Douce, R. & Neuberger, M. (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 214–222.

Hatch, M.C. (1987) C_4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 81–106.

Revisión de nivel intermedio por uno de los descubridores de la ruta C_4.

Sage, R.F. & Kubien, D.S. (2007) The temperature response of C3 and C4 plants. *Plant Cell Environ.* **30**, 1086–1106.

Tolbert, N.E. (1997) The C_2 oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 1–25.

Un relato personal fascinante del desarrollo de nuestros conocimientos sobre la fotorrespiración por parte de uno de sus protagonistas.

Biosíntesis del almidón y de la sacarosa

Ball, S.G., van de Wal, M.H.B.J., & Visser, R.G.F. (1998) Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends Plant Sci.* **3**, 462–467.

Delmer, D.P. (1999) Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 245–276.

Doblin, M.S., Kurek, I., Javob-Wilk, D., & Delmer, D.P. (2002) Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1407–1420.

Errington, J., Daniel, R.A., & Scheffers, D.J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 52–65.

Fernie, A.R., Willmitzer, L., & Trethewey, R.N. (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends Plant Sci.* **7**, 35–41.

Revisión de nivel intermedio de los genes y proteínas que intervienen en la síntesis del almidón en los tubérculos vegetales.

Huber, S.C. & Huber, J.L. (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 431–444.

Revisión breve de los factores que regulan este enzima clave.

Leloir, L.F. (1971) Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science* **172**, 1299–1303.

Conferencia Nobel de Leloir en la que se incluye una discusión sobre el papel de los azúcares nucleótidos en el metabolismo.

Mukerjea, R., Yu, L., & Robyt, J.F. (2002) Starch biosynthesis: mechanism for the elongation of starch chains. *Carbohydrate Res.* **337**, 1015–1022.

Datos recientes que demuestran que la cadena de almidón crece en su extremo *reductor*.

Síntesis de celulosa y peptidoglucano

Delmer, D.P. (1999) Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 245–276.

Dhugga, K.S. (2001) Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 488–493.

Joshi, C.P. & Mansfield, S.D. (2007) The cellulose paradox—simple molecule, complex biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 220–226.

Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., & Delmer, D. (2002) Sitosterol-β-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science* **295**, 147–150.

Pruebas recientes sobre la existencia de un intermediario lípido-oligosacárido en la síntesis de celulosa.

Reid, J.S.G. (2000) Cementing the wall: cell wall polysaccharide synthesising enzymes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 512–516.

Saxena, I.M. & Brown, R.M., Jr. (2005) Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann. Bot.* **96**, 9–21.

Scheible, W.-R. & Pauly, M. (2004) Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 285–296.

Taylor, N.G., Laurie, S., & Turner, S.R. (2000) Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 2529–2540.

Williamson, R.E., Burn, J.E., & Hocart, C.H. (2002) Towards the mechanism of cellulose synthesis. *Trends Plant Sci.* **7**, 461–467.

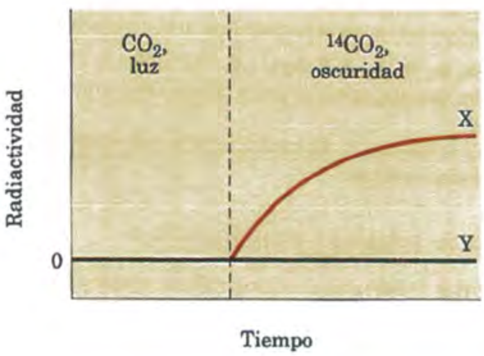
Problemas

1. Segregación del metabolismo en orgánulos ¿Qué ventajas obtiene la célula vegetal de tener diferentes orgánulos para llevar a cabo diferentes secuencias de reacciones que comparten intermediarios?

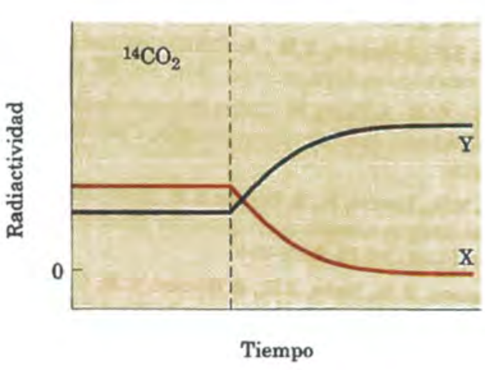
2. Fases de la fotosíntesis Cuando se ilumina una suspensión de algas verdes en ausencia de CO_2 y se incuban después en la oscuridad con $^{14}CO_2$, este $^{14}CO_2$ se convierte en [^{14}C]glucosa durante un tiempo breve. ¿Cuál es el significado de esta observación con respecto al proceso de asimilación de CO_2 y de qué forma se relaciona con las reacciones luminosas de la fotosíntesis? ¿Por qué se detiene la conversión de $^{14}CO_2$ en [^{14}C]glucosa después de un corto tiempo?

3. Identificación de intermediarios clave en la asimilación de CO_2 Calvin y colaboradores utilizaron el alga verde unicelular *Chlorella* para estudiar las reacciones de asimilación de carbono de la fotosíntesis. En sus experimentos incubaron $^{14}CO_2$ con suspensiones de algas iluminadas y siguieron el curso de la aparición de ^{14}C en dos compuestos, X e Y, en dos conjuntos de condiciones. Sugiera las identidades de X e Y basadas en su conocimiento del ciclo de Calvin.

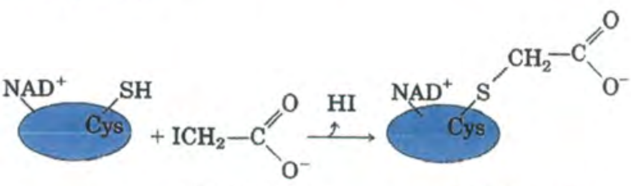
(a) Hicieron crecer *Chlorella* iluminada con CO_2 sin marcar; a continuación apagaron la luz y añadieron $^{14}CO_2$ (línea vertical a trazos en la gráfica inferior). En estas condiciones X fue el primer compuesto que se marcó con ^{14}C. El compuesto Y no se marcó.



(b) Hicieron crecer células de *Chlorella* iluminadas en presencia de $^{14}CO_2$. Continuaron con la iluminación hasta que desapareció todo el $^{14}CO_2$ (línea vertical a trazos en la gráfica inferior). En estas condiciones marcaron rápidamente el compuesto X pero perdió su radiactividad con el tiempo, mientras que el compuesto Y se hizo cada vez más radiactivo.



4. Regulación del ciclo de Calvin El yodoacetato reacciona irreversiblemente con los grupos —SH libres de residuos Cys de las proteínas.



Prediga qué enzima(s) del ciclo de Calvin serían inhibidos por el yodoacetato y explique por qué.

5. Tiorredoxina en la regulación de enzimas del ciclo de Calvin Motohashi y colaboradores* utilizaron tiorredoxina como anzuelo para "pescar" las proteínas de extractos vegetales que eran activadas por la tiorredoxina. Para ello, prepararon una tiorredoxina mutante en la que uno de los residuos Cys reactivos se reemplazaba por Ser. Explique por qué era necesaria esta modificación para sus experimentos.

6. Comparación de las rutas reductora y oxidativa de las pentosas fosfato La ruta *reductora* de las pentosas fosfato genera una serie de intermediarios idénticos a los de la ruta *oxidativa* de las pentosas fosfato (Capítulo 14). ¿Qué papel juega cada una de las rutas en las células en donde es activa?

7. Fotorrespiración y respiración mitocondrial Compare el ciclo oxidativo fotosintético del carbono (ciclo C_2), también llamado *fotorrespiración*, con la *respiración mitocondrial* que impulsa la síntesis de ATP. ¿Por qué a ambos procesos se les denomina respiración? ¿En qué parte de la célula tienen lugar y en qué circunstancias? ¿Cuál es la ruta de los electrones en cada uno de ellos?

8. Rubisco y la composición de la atmósfera N. E. Tolbert† ha argumentado que la especificidad doble de la rubisco respecto al CO_2 y al O_2 no es un vestigio de la evolución en una atmósfera pobre en oxígeno. Sugiere que las actividades relativas carboxilasa y oxigenasa de la rubisco de hecho han establecido, y ahora mantienen, la proporción de CO_2 y O_2 en la atmósfera terrestre. Discuta los pros y contras de esta hipótesis, en términos moleculares y en términos globales. ¿Cómo se explica la existencia de organismos C_4 con esta hipótesis?

9. Función de la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa ¿Cuál es el efecto sobre la célula y el organismo que podría tener lugar como consecuencia de un defecto de sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa en (a) un hepatocito humano y (b) en la célula de una hoja de una planta verde?

10. Ruta de la asimilación de CO_2 en el maíz Si se ilumina una planta de maíz en presencia de $^{14}CO_2$, después de aproximadamente 1 segundo más del 90% de la radiactividad total incorporada en las hojas se encuentra en los átomos C-4 del malato, aspartato y oxalacetato. Sólo después de 60 segundos aparece el ^{14}C en el átomo C-1 del 3-fosfoglicerato. Explíquelo.

*Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., & Hisabori, T. (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11,224–11,229.

†Tolbert, N.E. (1994) The role of photosynthesis and photorespiration in regulating atmospheric CO_2 and O_2. In *Regulation of Atmospheric CO_2 and O_2 by Photosynthetic Carbon Metabolism* (Tolbert, N.E. & Preiss, J., eds), pp. 8–33, Oxford University Press, New York.

11. Identificación de plantas CAM Si se ponen a su disposición $^{14}CO_2$ y todos los medios que se encuentran en un laboratorio de bioquímica típico, ¿cómo diseñaría un experimento sencillo para determinar si una planta es una planta C_4 típica o una planta CAM?

12. Química del enzima málico: variación sobre un tema El enzima málico, que se encuentra en las células túnico-vasculares de las plantas C_4, lleva a cabo una reacción que tiene su contrapartida en el ciclo del ácido cítrico. ¿Cuál es la reacción análoga? Explíquelo.

13. ¿Cuál es el coste de almacenar glucosa en forma de almidón? Escriba la secuencia de pasos y la reacción neta requerida para calcular el coste, en número de moléculas de ATP, para convertir una molécula de glucosa 6-fosfato citosólica en almidón y de nuevo en glucosa 6-fosfato. ¿Qué fracción del número máximo de moléculas de ATP disponibles a partir del catabolismo completo de la glucosa 6-fosfato a CO_2 y H_2O representa este coste?

14. Pirofosfato inorgánico hidrolasa El enzima pirofosfato inorgánico hidrolasa contribuye a que muchas reacciones biosintéticas que generan pirofosfato sean esencialmente irreversibles en la célula. Al mantener la concentración de PP_i muy baja, el enzima "tira" de estas reacciones en la dirección de formación de PP_i. La síntesis de ADP-glucosa en los cloroplastos es una reacción que discurre en el sentido directo gracias a este mecanismo. Sin embargo, la síntesis de UDP-glucosa en el citosol de las plantas, que produce PP_i, es fácilmente reversible in vivo. ¿Cómo reconcilia estos dos hechos?

15. Regulación de la síntesis de almidón y de sacarosa La síntesis de sacarosa tiene lugar en el citosol y la de almidón en el estroma de los cloroplastos; no obstante, los dos procesos están finamente equilibrados. ¿Qué factores desplazan las reacciones en favor de (a) la síntesis de almidón y (b) la síntesis de sacarosa?

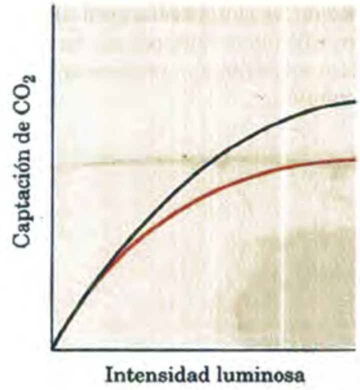
16. Regulación de la síntesis de sacarosa En la regulación de la síntesis de sacarosa a partir de triosas fosfato producidas en la fotosíntesis, el 3-fosfoglicerato y el P_i juegan ambos un papel clave (véase la Fig. 20-26). Explique el motivo por el cual las concentraciones de estos dos reguladores reflejan la velocidad de la fotosíntesis.

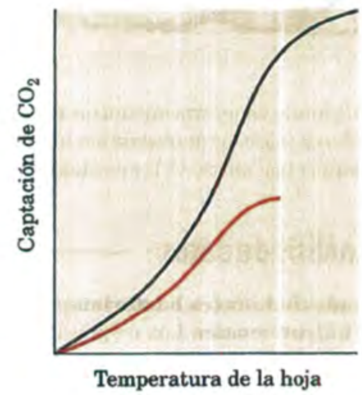
17. Sacarosa y caries dental La infección más común en la especie humana es la caries dental, que surge de la colonización y destrucción del esmalte dental por diversos microorganismos acidificantes. Estos organismos sintetizan una red de dextranos insolubles en agua, denominada placa dental, sobre la que viven, y que está compuesta por polímeros de glucosa en enlace ($\alpha 1 \rightarrow 6$) con muchos puntos de ramificación ($\alpha 1 \rightarrow 3$). La polimerización del dextrano requiere sacarosa de la dieta, siendo la reacción catalizada por un enzima bacteriano, la dextrano-sacarosa glucosiltransferasa.

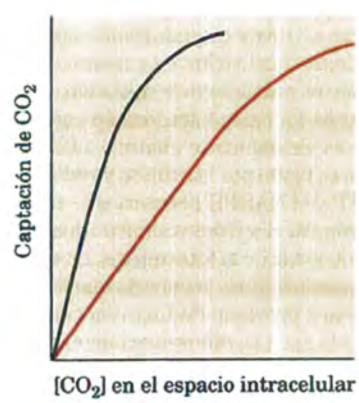
(a) Escriba la reacción global de la polimerización del dextrano.

(b) Además de proporcionar un sustrato para la formación de la placa dental ¿de qué modo la sacarosa de la dieta proporciona a las bacterias bucales una fuente abundante de energía metabólica?

18. Diferencias entre plantas C_3 y C_4 Las plantas del género *Atriplex* incluyen algunas especies C_3 y algunas especies C_4. A partir de los datos de los gráficos siguientes (especie 1, curva negra; especie 2, curva roja) identifique cuál de las dos es la planta C_3 y cuál la C_4. Justifique su respuesta en términos moleculares que expliquen los datos de las tres gráficas.







19. Ruta C_4 en una célula individual En las plantas C_4 típicas, la captura inicial del CO_2 tiene lugar en un tipo de célula, mientras que las reacciones del ciclo de Calvin tienen lugar en otro (véase la Fig. 20-23). Voznesenskaya y colaboradores[‡] han descrito una planta, *Bienertia cycloptera*, que crece en depresiones salinas del semidesierto en Asia Central, que muestra las propiedades bioquímicas de una planta C_4 pero que, a diferencia de las plantas C_4 típicas, no separa las reacciones de fijación de CO_2 en dos tipos de célula. La PEP carboxilasa y la rubisco se encuentran en la misma célula. Sin embargo, las células tienen dos tipos de cloroplastos localizados de forma diferente. Un tipo con relativamente pocos grana (tilacoides) está confinado en la periferia; los cloroplastos más típicos se agrupan en el centro

[‡]Voznesenskaya, E.V., Fraceschi, V.R., Kiirats, O., Artyusheva, E.G., Freitag, H., & Edwards, G.E. (2002) Proof of C_4 photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Plant J.* **31**, 649-662.

de la célula, separados de los cloroplastos periféricos por grandes vacuolas. Puentes citosólicos finos pasan a través de las vacuolas y conectan el citosol periférico con el central, tal como se muestra en la parte inferior.

En esta planta ¿dónde esperaría encontrar (a) la PEP carboxilasa, (b) la rubisco y (c) los gránulos de almidón? Explíquelo con un modelo para la fijación de CO_2 en estas células C_4.

Problema de análisis de datos

20. Rubisco de endosimbiontes bacterianos de animales de respiraderos hidrotermales Los respiraderos, o chimeneas, hidrotermales submarinos sostienen ecosistemas notables. En estas profundidades extremas no hay luz para que se dé la fotosíntesis y no obstante se encuentran comunidades que prosperan en los respiraderos. Gran parte de su productividad primaria tiene lugar a través de quimiosíntesis realizada por simbiontes bacterianos que viven en órganos especializados (trofosomas) de ciertos animales de respiraderos.

La quimiosíntesis en estas bacterias se consigue a través de un proceso que es virtualmente idéntico a la fotosíntesis. El dióxido de carbono es fijado por la rubisco y reducido a glucosa, mientras que el ATP y el NADPH necesarios se producen en un proceso de transferencia electrónica similar a los de las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis. La diferencia clave está en que en la quimiosíntesis la energía que impulsa la transferencia de electrones proviene de una reacción química muy exergónica y no de la luz. Las diferentes bacterias quimiosintéticas utilizan diferentes reacciones con este fin. Las bacterias que se encuentran en los animales que habitan los respiraderos hidrotermales utilizan típicamente la oxidación de H_2S (abundante en el agua de los respiraderos) por el O_2, produciendo azufre elemental. Estas bacterias también utilizan la conversión de H_2S a azufre como fuente de electrones para la reducción quimiosintética del CO_2.

(a) ¿Cuál es la reacción global de la quimiosíntesis en estas bacterias? No es necesario que iguale la ecuación; dé solamente los materiales de partida y los productos.

(b) En último término estas bacterias endosimbióticas obtienen su energía de la luz solar. Explique por qué.

Robinson y colaboradores (2003) exploraron las propiedades de la rubisco del endosimbionte bacteriano del gusano tubular gigante *Riftia pachyptila*. La rubisco, sea del origen que sea, cataliza la reacción del CO_2 (Fig. 20–7) o del O_2 (Fig. 20–20) con la ribulosa 1,5-bisfosfato. En general, la rubisco reacciona más rápidamente con el CO_2 que con el O_2. El grado de selectividad (Ω) puede expresarse como:

$$\frac{V_{\text{carboxilación}}}{V_{\text{oxigenación}}} = \Omega \frac{[CO_2]}{[O_2]}$$

en donde V es la velocidad de reacción.

Robinson y colaboradores midieron el valor de Ω de la rubisco de endosimbiontes bacterianos. Purificaron la rubisco de los trofosomas de los gusanos tubulares, la hicieron reaccionar con mezclas de diferentes proporciones de O_2 y CO_2 en presencia de [1-^{3}H]ribulosa 1,5-bisfosfato y midieron la razón de [^{3}H]fosfoglicerato a [^{3}H]fosfoglicolato.

(c) La razón medida de [^{3}H]fosfoglicerato a [^{3}H]fosfoglicolato es igual a la de $V_{\text{carboxilación}}/V_{\text{oxigenación}}$. Explique por qué.

(d) ¿Por qué la [5-^{3}H]ribulosa 1,5-bisfosfato no sería un buen sustrato para este ensayo?

La Ω para la rubisco del endosimbionte tenía un valor de $8{,}6 \pm 0{,}9$.

(e) La concentración (molar) atmosférica de O_2 es del 20% y la del CO_2 es de unas 380 partes por millón. Si el endosimbionte tuviese que llevar a cabo la quimiosíntesis en estas condiciones atmosféricas, ¿cuál sería el valor de $V_{\text{carboxilación}}/V_{\text{oxigenación}}$?

(f) Basándose en su respuesta en (e), ¿esperaría que la Ω para la rubisco de una planta terrestre fuese superior, igual o inferior a 8,6? Explique sus argumentos.

En el ambiente se encuentran dos isótopos estables del carbono: el más abundante ^{12}C y el raro ^{13}C. Todos los enzimas rubisco catalizan la fijación de $^{12}CO_2$ más rápidamente que la de $^{13}CO_2$. El resultado es que la glucosa está ligeramente enriquecida en ^{12}C en comparación con la composición isotópica de CO_2 del entorno. Hay diversos factores que intervienen en este uso "preferente" de $^{12}CO_2$, si bien uno de ellos es la física fundamental de los gases. La temperatura de un gas está relacionada con la energía cinética de sus moléculas. La energía cinética viene dada por $\frac{1}{2}mv^2$, en donde m es la masa molecular y v la velocidad. Así, a la misma temperatura (misma energía cinética) las moléculas de un gas más ligero se moverán más rápidamente que las de un gas más pesado.

(g) ¿De qué modo esto contribuiría a la "preferencia" de la rubisco por el $^{12}CO_2$ frente al $^{13}CO_2$?

Algunas de las primeras pruebas convincentes de que los huéspedes de los gusanos tubulares obtenían su carbono fijado de los endosimbiontes fue que la razón $^{13}C/^{12}C$ en los animales era mucho más próxima a la de las bacterias que a la de los animales marinos que no habitaban los respiraderos.

(h) ¿Por qué es ésta una prueba más convincente de una relación simbiótica que los estudios anteriores que mostraban simplemente la presencia de rubisco en las bacterias encontradas en los trofosomas?

Referencia

Robinson, J.J., Scott, K.M., Swanson, S.T., O'Leary, M.H., Horken, K., Tabita, F.R., & Cavanaugh, C.M. (2003) Kinetic isotope effect and characterization of form II RubisCO from the chemoautotrophic endosymbionts of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Limnol. Oceanogr.* **48**, 48–54.

21

> No recuerdo cómo se realizó el reparto del "botín"; quizá fue por sorteo de lotes. Sea como fuere, a David Shemin le "tocó" el metabolismo de aminoácidos, lo que le condujo a su trabajo clásico sobre la biosíntesis del hemo. David Rittenburg continuó con su interés en la síntesis y recambio de proteínas mientras que los lípidos iban a ser mi territorio.
>
> —*Konrad Bloch, sobre como su carrera se dirigió hacia problemas del metabolismo de lípidos después de la muerte de su tutor, Rudolf Schoenheimer; artículo en* Annual Review of Biochemistry, *1987*

Biosíntesis de lípidos

Los lípidos realizan diversas funciones celulares, de las que algunas sólo se han descubierto recientemente. Constituyen la forma principal de energía almacenada en la mayoría de organismos y son constituyentes principales de las membranas celulares. Hay lípidos especializados que actúan como pigmentos (retinal, caroteno), cofactores (vitamina K), detergentes (sales biliares), transportadores (dolicoles), hormonas (derivados de la vitamina D, hormonas sexuales), mensajeros extra e intracelulares (icosanoides y derivados del fosfatidilinositol) y anclaje de proteínas de membrana (ácidos grasos unidos covalentemente, grupos prenilo y fosfatidilinositol). La capacidad para la síntesis de los diversos lípidos es, por consiguiente, esencial para todos los organismos. Este capítulo describe las rutas biosintéticas de algunos de los principales lípidos presentes en la mayoría de células, con las que se ilustran las estrategias empleadas en la construcción de estos productos insolubles en agua a partir de precursores hidrosolubles sencillos tales como el acetato. Al igual que sucede con otras rutas biosintéticas, estas secuencias de reacción son endergónicas y reductoras. Utilizan ATP como fuente de energía metabólica y un transportador electrónico reducido (normalmente NADPH) como reductor.

Describiremos en primer lugar la biosíntesis de los ácidos grasos, componentes primarios de los triacilgliceroles y los fosfolípidos. A continuación examinaremos la incorporación de los ácidos grasos en los triacilgliceroles y en los tipos más sencillos de fosfolípidos de membrana. Finalmente consideraremos la síntesis del colesterol, componente de algunas membranas y precursor de productos esteroideos tales como los ácidos biliares, las hormonas sexuales y las hormonas de la corteza suprarrenal.

21.1 Biosíntesis de ácidos grasos e icosanoides

Cuando se descubrió que la oxidación de los ácidos grasos transcurría mediante la eliminación oxidativa sucesiva de unidades de dos carbonos (acetil-CoA) (véase la Fig. 17–8), los bioquímicos creyeron que la biosíntesis de los ácidos grasos podría tener lugar mediante la simple inversión de los mismos pasos enzimáticos. No obstante, tal como se vería más adelante, la biosíntesis y la degradación de los ácidos grasos transcurren por vías diferentes, están catalizadas por conjuntos de enzimas distintos y tienen lugar en partes diferentes de la célula. Además, en la biosíntesis de los ácidos grasos participa un intermediario de tres carbonos, el **malonil-CoA,** que no interviene en la degradación.

Malonil-CoA

En primer lugar nos fijaremos en la ruta de síntesis de los ácidos grasos para ocuparnos después de la regulación de la ruta y de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos insaturados y sus derivados icosanoides.

El malonil-CoA se forma a partir del acetil-CoA y del bicarbonato

La formación del malonil-CoA a partir del acetil-CoA es un proceso irreversible catalizado por la **acetil-CoA carboxilasa.** El enzima bacteriano tiene tres subunidades polipeptídicas diferentes **(Fig. 21–1)**; en las células animales las tres actividades son parte de un único polipéptido multifuncional. Las células vegetales contienen ambos tipos de acetil-CoA carboxilasa. En todos los casos el enzima contiene un grupo prostético biotina, unido mediante un enlace covalente tipo amida al grupo ε-amino de un residuo Lys que se encuentra en uno de los tres poli-

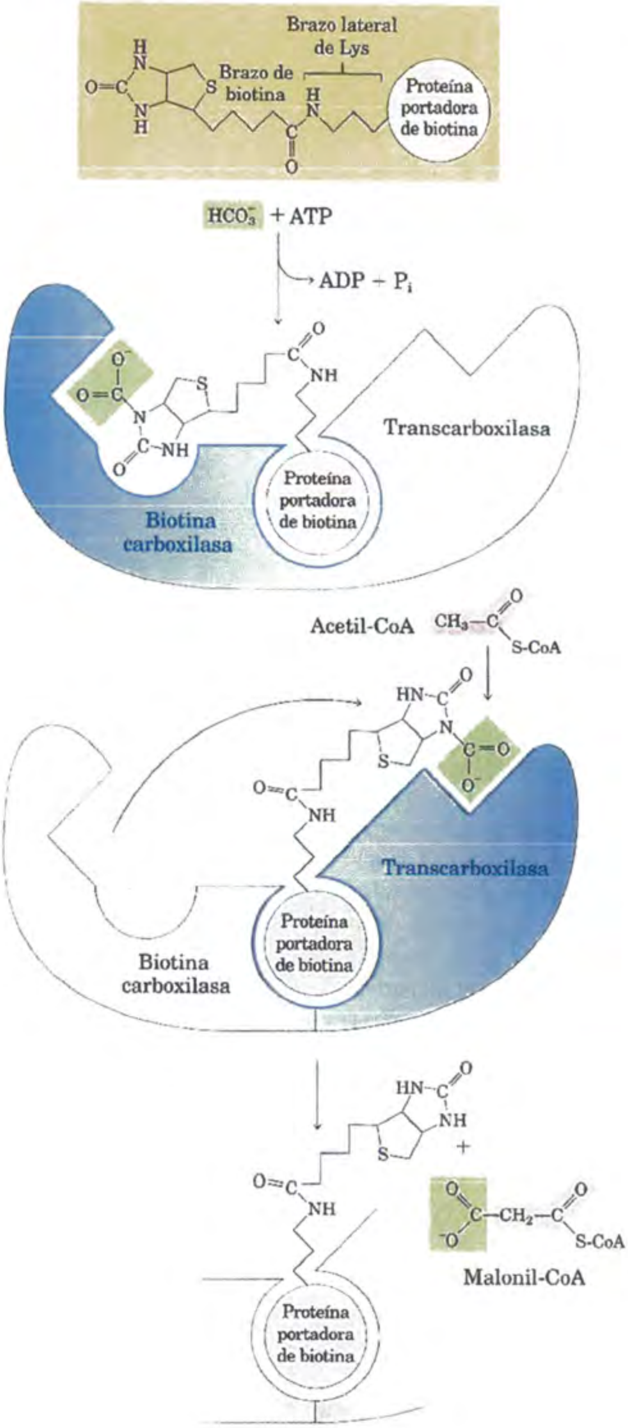


FIGURA 21–1 Reacción de la acetil-CoA carboxilasa. La acetil-CoA carboxilasa tiene tres regiones funcionales: proteína portadora de biotina (gris); biotina carboxilasa, que activa el CO_2 uniéndolo a un nitrógeno del anillo de la biotina en una reacción dependiente de ATP (véase la Fig. 16–16), y transcarboxilasa, que transfiere el CO_2 activado (sombreado en verde) desde la biotina hasta el acetil-CoA, produciendo malonil-CoA. El brazo largo y flexible de la biotina transporta el CO_2 activado desde la región de la biotina carboxilasa hasta el sitio activo de la transcarboxilasa. En cada caso el enzima activo está sombreado en azul.

péptidos o dominios de la molécula enzimática. La reacción en dos pasos catalizada por este enzima es muy parecida a otras reacciones de carboxilación dependientes de biotina, tales como las catalizadas por la piruvato carboxilasa (véase la Fig. 16–16) y la propionil-CoA carboxilasa (véase la Fig. 17–11). Un grupo carboxilo obtenido del bicarbonato (HCO_3^-) se transfiere en primer lugar a la biotina en una reacción dependiente de ATP. El grupo biotinilo actúa como transportador temporal de CO_2, transfiriéndolo al acetil-CoA en el segundo paso para dar malonil-CoA.

La síntesis de ácidos grasos transcurre mediante una secuencia de reacciones repetidas

En todos los organismos, las cadenas carbonadas largas de los ácidos grasos se forman mediante una secuencia repetida de reacciones con cuatro etapas **(Fig. 21–2)**, catalizadas por un sistema al que se denomina colectivamente **ácido graso sintasa.** Un grupo acilo saturado formado en este conjunto de reacciones constituye el sustrato de la siguiente condensación con un grupo malonilo activado. En cada paso a través del ciclo la cadena acilo graso se alarga dos carbonos.

Tanto el cofactor que transporta electrones como los grupos activadores de la secuencia anabólica reductora son diferentes de los que actúan en el proceso oxidativo catabólico. Recuerde que en la β-oxidación, los aceptores electrónicos son NAD^+ y FAD, y que el grupo activador es el grupo tiol (—SH) del coenzima A (véase la Fig. 17–8). En cambio, el agente reductor en la secuencia de síntesis es el NADPH y los grupos activadores son dos grupos —SH diferentes unidos al enzima, que se describen más adelante.

Existen dos variantes principales de ácido graso sintasa: la ácido graso sintasa I (FAS I), que se encuentra en los vertebrados y hongos, y la ácido graso sintasa II (FAS II), de plantas y bacterias. La FAS I que se encuentra en los vertebrados consta de una única cadena polipeptídica multifuncional (M_r 240.000). La FAS I de mamíferos es el prototipo. Siete sitios activos diferentes para reacciones diferentes se encuentran en dominios separados **(Fig. 21–3a)**. El polipéptido de mamíferos funciona con un homodímero (M_r 480.000). Parece ser que las subunidades funcionan de forma independiente. Cuando todos los sitios activos de una subunidad se inactivan por mutación, la síntesis de ácidos grasos sólo se reduce modestamente. En las levaduras y otros hongos se encuentra una FAS I liperamente diferente formada por dos polipéptidos multifuncionales que forman un complejo con una arquitectura diferente de la de los vertebrados (Fig. 21–3b). Tres de los siete sitios activos necesarios se encuentran en la subunidad α, mientras que en la subunidad β hay cuatro.

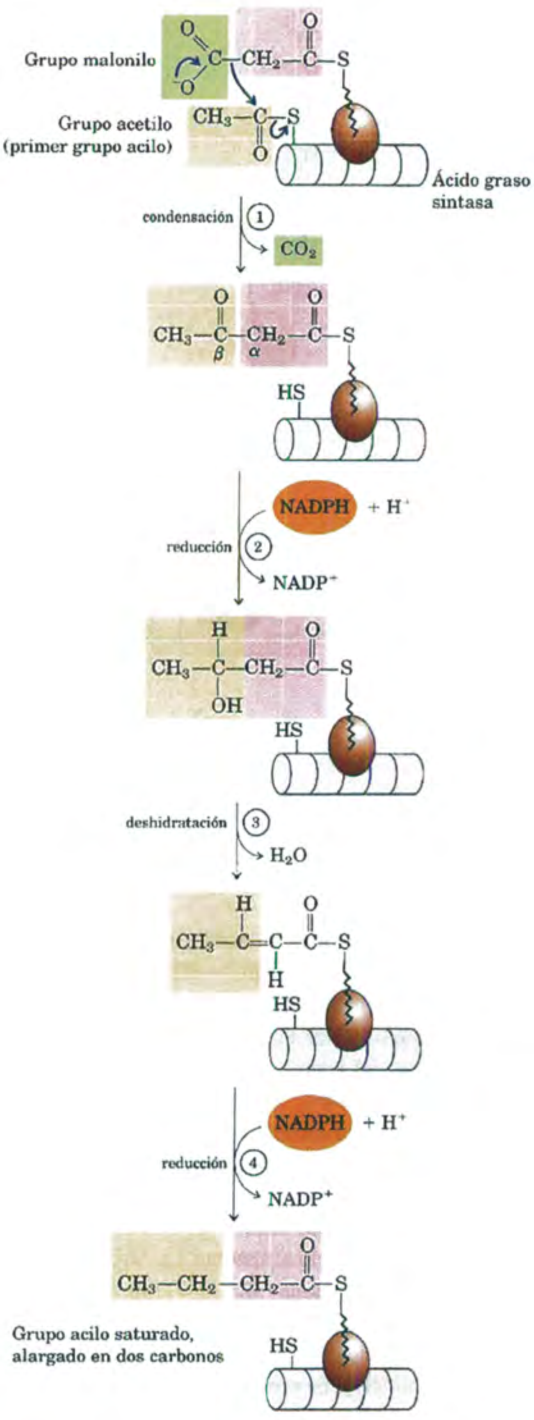


FIGURA 21–2 Adición de dos carbonos a una cadena acilo graso en crecimiento: secuencia de cuatro pasos. Cada grupo malonilo y acetilo (o acilo más largo) es activado por un tioéster que lo une a la ácido graso sintasa, un sistema multienzimático descrito posteriormente en el texto. ① La condensación de un grupo acilo activado (un grupo acetilo procedente del acetil-CoA es el primer grupo acilo) y dos carbonos procedentes del malonil-CoA, con la eliminación de CO_2 del grupo malonilo, extiende la cadena acílica en dos carbonos. Se presenta el mecanismo de la primera etapa de esta reacción para ilustrar la función de la descarboxilación que facilita la condensación. El producto β-ceto de esta condensación se reduce a continuación en tres pasos casi idénticos a las reacciones de la β-oxidación, pero en secuencia inversa: ② el grupo β-ceto se reduce a alcohol, ③ la eliminación de H_2O crea un doble enlace y ④ el doble enlace se reduce para formar el correspondiente grupo acilo graso saturado.

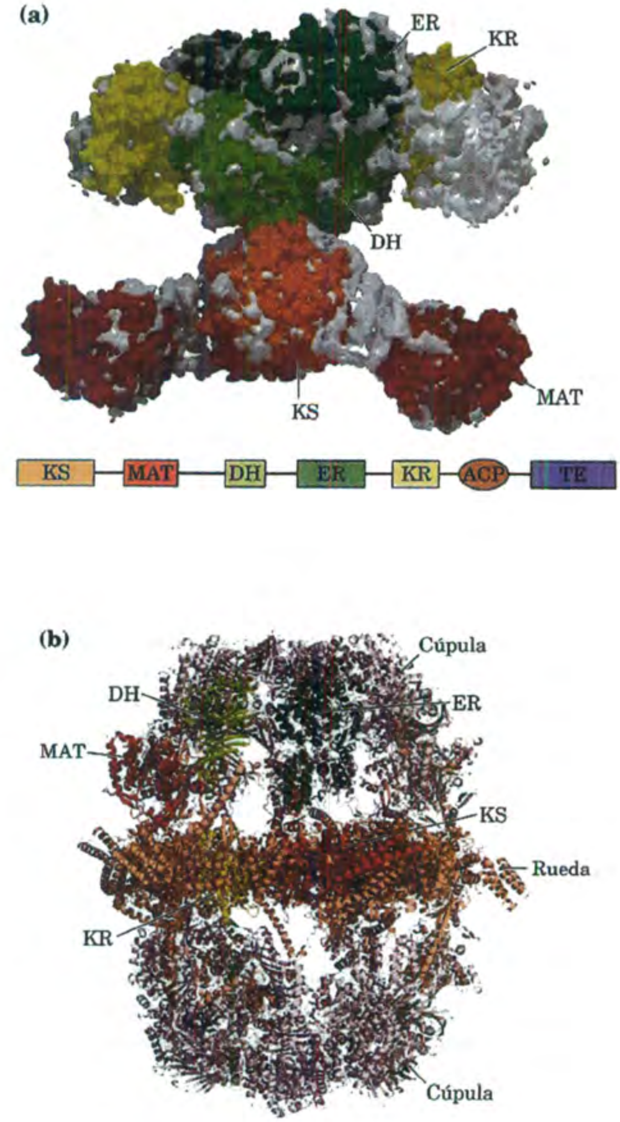


FIGURA 21–3 Estructura de los sistemas ácido graso sintasa de tipo I. Se muestran las estructuras de baja resolución de sistemas enzimáticos **(a)** de mamífero (porcino; de PDB ID 2CF2) y **(b)** fúngicos (de PDB ID 2UV9, 2UVA, 2UVB y 2UVC). **(a)** Todos los sitios activos en el sistema de mamíferos están localizados en diferentes dominios dentro de un único polipéptido grande. Las diferentes actividades enzimáticas son: β-cetoacil-ACP sintasa (KS), malonil/acetil-CoA-ACP transferasa (MAT), β-hidroxiacil-ACP deshidratasa (DH), enoil-ACP reductasa (ER) y β-cetoacil-ACP reductasa (KR). ACP es la proteína portadora de acilos. En el panel inferior se muestra el ordenamiento lineal de los dominios en el polipéptido. El séptimo dominio (TE) es una tioesterasa que libera el producto palmitato del ACP cuando se ha completado la síntesis. Los dominios ACP y TE están desordenados en el cristal y, en consecuencia, no se muestran en la estructura. **(b)** En la estructura de la FAS I del hongo *Thermomyces lanuginosus*, los mismos sitios activos se dividen entre dos cadenas polipeptídicas multifuncionales que actúan conjuntamente. En el complejo heterododecamérico se encuentran seis copias del polipéptido. En el centro del complejo se encuentra una rueda de seis subunidades α, que incluyen la ACP así como los sitios activos de KS y KR. En la rueda se encuentran tres unidades en una cara y tres en la otra. A ambos lados de la rueda se encuentran cúpulas formadas por trímeros de las subunidades β (que contienen los sitios activos de ER y DH, así como dos dominios con sitios activos análogos a la MAT del enzima de mamíferos. Los dominios de uno de cada tipo de subunidad están coloreados según los colores del sitio activo del enzima de mamífero en **(a)**.

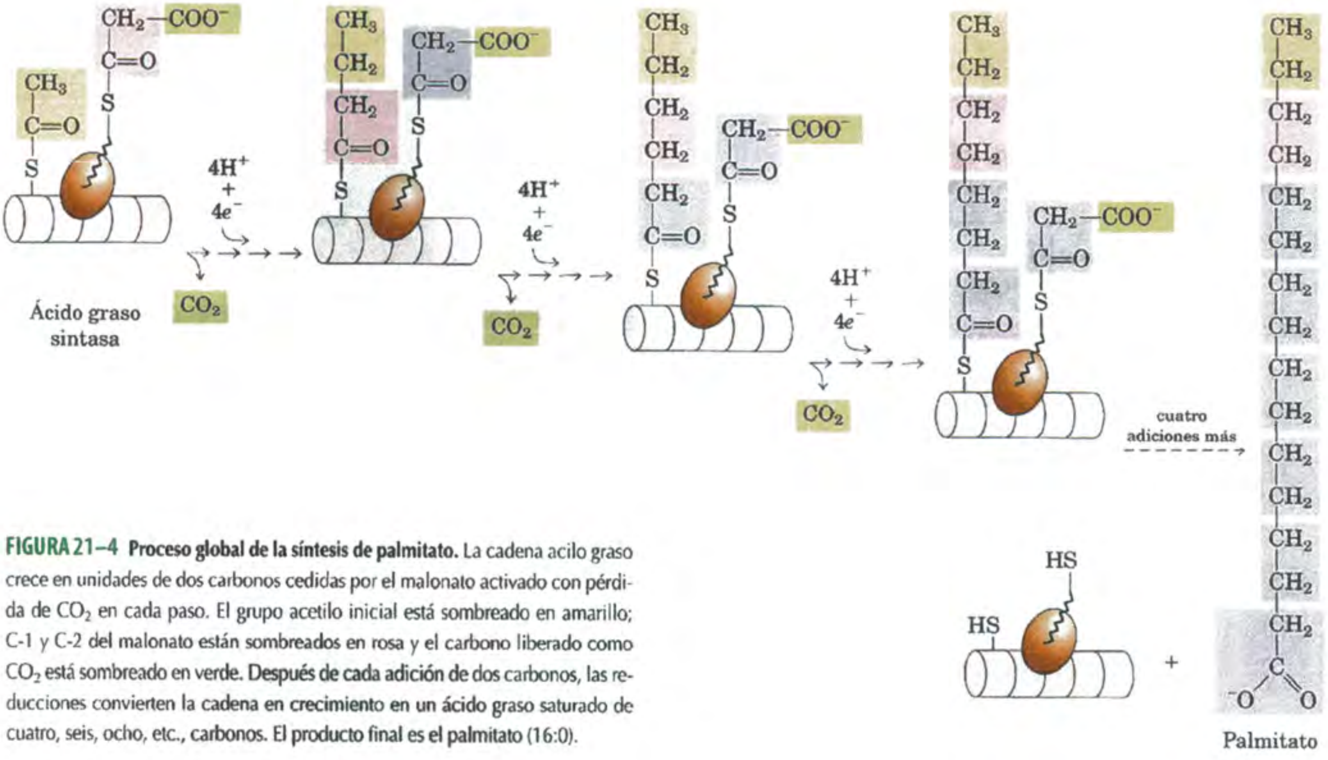


FIGURA 21–4 Proceso global de la síntesis de palmitato. La cadena acilo graso crece en unidades de dos carbonos cedidas por el malonato activado con pérdida de CO_2 en cada paso. El grupo acetilo inicial está sombreado en amarillo; C-1 y C-2 del malonato están sombreados en rosa y el carbono liberado como CO_2 está sombreado en verde. Después de cada adición de dos carbonos, las reducciones convierten la cadena en crecimiento en un ácido graso saturado de cuatro, seis, ocho, etc., carbonos. El producto final es el palmitato (16:0).

Con los sistemas FAS I, la síntesis de ácidos grasos lleva a un solo producto y no se liberan intermediarios. Cuando la cadena alcanza la longitud de 16 carbonos, el producto (palmitato, 16:0; véase la Tabla 10–1) abandona el ciclo. Los carbonos C-16 y C-15 del palmitato provienen de los átomos de carbono del metilo y del carboxilo, respectivamente, de un acetil-CoA utilizado directamente para cebar el sistema al principio (**Fig. 21–4**); el resto de los átomos de carbono de la cadena provienen del acetil-CoA vía malonil-CoA.

La FAS II de plantas y bacterias es un sistema disociado; cada paso de la síntesis está catalizado por un enzima diferente fácilmente difusible. Los intermediarios también difunden y pueden desviarse a otras rutas (tales como la síntesis de ácido lipoico). A diferencia de FAS I, la FAS II genera diversos productos entre los que se cuentan ácidos grasos saturados de diferentes longitudes, así como ácidos grasos insaturados, ramificados e hidroxilados.

En las mitocondrias de vertebrados también se encuentra un sistema FAS II. La siguiente discusión se centra en la FAS I de mamíferos.

El complejo del ácido graso sintasa de mamíferos tiene múltiples sitios activos

Los diversos dominios de la FAS I de mamíferos funcionan como enzimas distintos pero unidos. El sitio activo de cada enzima se encuentra en un dominio diferente dentro del gran polipéptido. A lo largo de todo el proceso los intermedios permanecen unidos covalentemente en forma de tioésteres a uno de dos grupos tiol. Un sitio de unión es el grupo —SH de un residuo Cys en uno de los dominios de la sintasa (β-cetoacil-ACP sintasa; KS); el otro es el grupo —SH de la proteína portadora de acilos, un dominio separado del mismo polipéptido. La hidrólisis de los tioésteres es una reacción muy exergónica; la energía liberada ayuda a que dos pasos diferentes (① y ⑤ de la Fig. 21–6) en la síntesis de ácidos grasos (condensación) sean termodinámicamente favorables.

La **proteína transportadora de acilos (ACP)** es la lanzadora que mantiene unido el sistema. La ACP de *Escherichia coli* es una proteína pequeña (M_r 8.860) que contiene el grupo prostético **4'-fosfopanteteína** (**Fig. 21–5**; compárese con el ácido pantoténico y la fracción β-mercaptoetilamina del coenzima A en la Fig. 8–38). Se cree que el grupo prostético 4'-fosfopanteteína de la ACP de *E. coli* sirve de brazo flexible que une la cadena acilo graso creciente a la superficie del complejo de la ácido graso sintasa al tiempo que lleva los intermediarios de la reacción desde un sitio activo del enzima al siguiente. La ACP de mamíferos tiene una función similar y el mismo grupo prostético; sin embargo, tal como hemos visto, está incrustado en forma de dominios dentro de un polipéptido multifuncional mucho mayor.

El ácido graso sintasa recibe los grupos acetilo y malonilo

Antes de que puedan empezar las reacciones de condensación que construyen la cadena de ácido graso, se han de cargar los

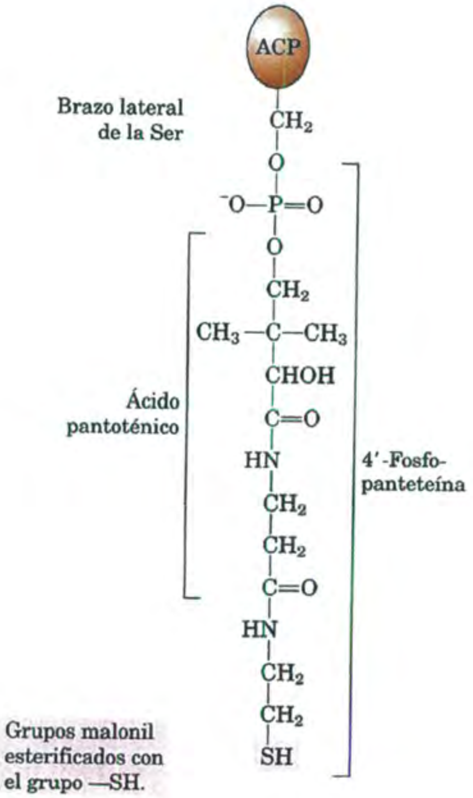


FIGURA 21–5 Proteína portadora de acilos (ACP). El grupo prostético es la 4'-fosfopanteteína, que está unida covalentemente al grupo hidroxilo de un residuo Ser en la ACP. La fosfopanteteína contiene la vitamina B ácido pantoténico, que también se encuentra en la molécula de coenzima A. Su grupo —SH es el sitio de entrada de grupos malonilo durante la síntesis de ácidos grasos.

dos grupos tiol del complejo enzimático con los grupos acilos correctos (**Fig. 21–6**, parte superior). En primer lugar se transfiere el grupo acetilo del acetil-CoA a la ACP en una reacción catalizada por el dominio **malonil/acetil-CoA–ACP transferasa** (MAT en la Fig. 21–6) del polipéptido multifuncional. A continuación se transfiere el grupo acetilo al grupo —SH de la Cys de la **β-cetoacil-ACP sintasa** (KS). La segunda reacción, transferencia del grupo malonilo desde el malonil-CoA al grupo —SH de la ACP, está también catalizada por la malonil/acetil-CoA–ACP transferasa. En el complejo de la sintasa cargada, los grupos acetilo y malonilo están activados para el proceso de alargamiento de la cadena. Los cuatro primeros pasos de este proceso los consideramos ahora en cierto detalle; todos los números de las etapas se refieren a la Figura 21-6.

Paso ① Condensación La primera reacción en la formación de una cadena de ácido graso es una condensación de Claisen formal en la que intervienen los grupos acetilo y malonilo activados para formar **acetoacetil-ACP,** un grupo acetoacetilo unido a la ACP a través del grupo —SH de la fosfopanteteína; simultáneamente se produce una molécula de CO_2. En esta reacción, catalizada por la β-cetoacil-ACP sintasa, se transfiere el grupo acetilo desde el grupo —SH de la Cys del enzima al grupo malonilo que se encuentra unido al —SH de ACP, convirtiéndose en la unidad metilo terminal de dos carbonos del nuevo grupo acetoacetilo.

El átomo de carbono del CO_2 formado en esta reacción es el mismo átomo de carbono que se introdujo originalmente en el malonil-CoA a partir del HCO_3^- mediante la reacción de la acetil-CoA carboxilasa (Fig. 21–1). Así, el CO_2 sólo se encuentra transitoriamente en enlace covalente durante la biosíntesis de ácidos grasos; se elimina a medida que se inserta cada unidad de dos carbonos.

¿Por qué las células se toman la molestia de adicionar CO_2 para formar un grupo malonilo a partir de un grupo acetilo, sólo para perderlo de nuevo durante la formación de acetoacetato? Recuérdese que en la β-oxidación de los ácidos grasos (véase la Fig. 17–8) la rotura del enlace entre dos grupos acilo (la rotura de una unidad acetilo de la cadena acilo) es muy exergónica, por lo que la simple condensación de dos grupos acilo (de dos moléculas de acetil-CoA, por ejemplo) es muy endergónica. La reacción de condensación es termodinámicamente favorable gracias a la intervención del malonilo activado en lugar de los grupos acetilo. El carbono metilénico (C-2) del grupo malonilo, situado entre los carbonos carbonílico y carboxílico, es un nucleófilo muy bueno. En el paso de la condensación (paso ①), la descarboxilación del grupo malonilo facilita el ataque nucleofílico del carbono metilénico sobre el tioéster que une el grupo acetilo a la β-cetoacil-ACP sintasa, desplazando el grupo —SH del enzima. El acoplamiento de la condensación a la descarboxilación del grupo malonilo hace que el proceso sea globalmente muy exergónico. Una secuencia similar de carboxilación-descarboxilación facilita la formación de fosfoenolpiruvato a partir del piruvato en la gluconeogénesis (véase la Fig. 14–17).

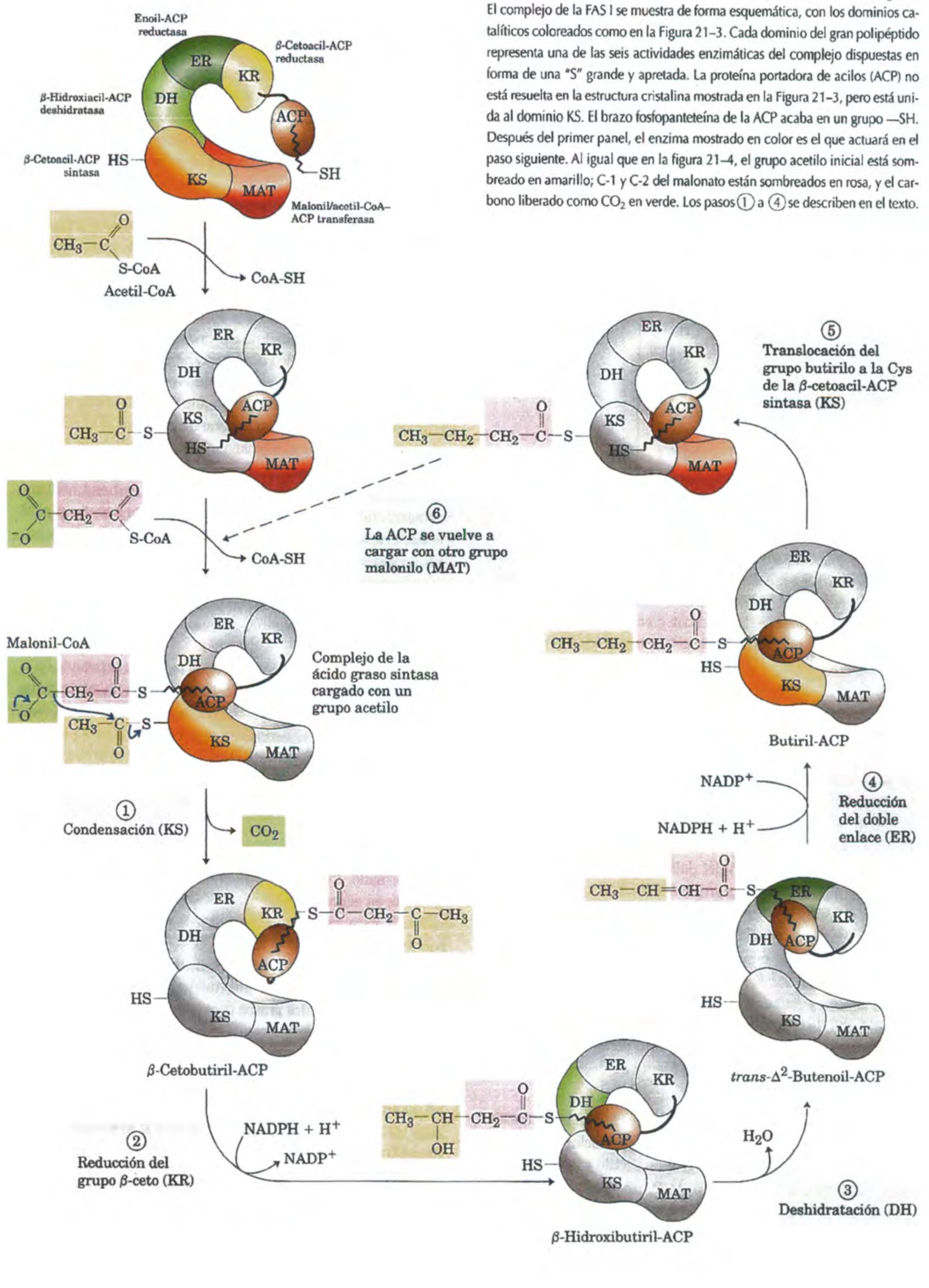
Mediante la utilización de grupos malonilo activados en la síntesis de ácidos grasos y de acetato activado en su degradación, la célula consigue que ambos procesos sean favorables energéticamente aunque uno sea el inverso del otro. La energía extra requerida para que la síntesis de ácidos grasos sea favorable la proporciona el ATP utilizado para sintetizar malonil-CoA a partir de acetil-CoA y HCO_3^- (Fig. 21–1).

Paso ② Reducción del grupo carbonilo El acetoacetil-ACP formado en la etapa de condensación se reduce seguidamente en el grupo carbonilo en C-3 formando D-β-hidroxibutiril-ACP. Esta reacción está catalizada por la **β-cetoacil-ACP reductasa** (KR), siendo el NADPH el dador electrónico. Obsérvese que el grupo D-β-hidroxibutirilo no tiene la misma forma esteroisómera que el intermedio L-β-hidroxiacilo en la oxidación de los ácidos grasos (véase la Fig. 17–8).

Paso ③ Deshidratación Se eliminan ahora los elementos del agua de C-2 y C-3 del D-β-hidroxibutiril-ACP, formándose un doble enlace en el producto ***trans*-Δ^2-butenoil-ACP.** El enzima que cataliza esta deshidratación es la **β-hidroxiacil-ACP deshidratasa** (DH).

Paso ④ Reducción del doble enlace Finalmente, el doble enlace del *trans*-Δ^2-butenoil-ACP se reduce (satura) formando **butiril-ACP** por acción de la **enoil-ACP reductasa** (ER); de nuevo el dador electrónico es el NADPH.

FIGURA 21–6 Secuencia de reacciones durante la síntesis de un ácido graso. El complejo de la FAS I se muestra de forma esquemática, con los dominios catalíticos coloreados como en la Figura 21–3. Cada dominio del gran polipéptido representa una de las seis actividades enzimáticas del complejo dispuestas en forma de una "S" grande y apretada. La proteína portadora de acilos (ACP) no está resuelta en la estructura cristalina mostrada en la Figura 21–3, pero está unida al dominio KS. El brazo fosfopanteteína de la ACP acaba en un grupo —SH. Después del primer panel, el enzima mostrado en color es el que actuará en el paso siguiente. Al igual que en la figura 21–4, el grupo acetilo inicial está sombreado en amarillo; C-1 y C-2 del malonato están sombreados en rosa, y el carbono liberado como CO_2 en verde. Los pasos ① a ④ se describen en el texto.



Las reacciones del ácido graso sintasa se repiten hasta formar palmitato

La producción del acilo graso saturado-ACP de cuatro carbonos completa un paso a través del complejo de la ácido graso sintasa. El grupo butirilo es ahora transferido desde el grupo —SH de la ACP al grupo —SH de la Cys de la β-cetoacil-ACP sintasa, el cual era portador inicialmente del grupo acetilo (Fig. 21–6). Para empezar el siguiente ciclo de cuatro reacciones que alarga la cadena en dos carbonos más, se une otro grupo malonilo al grupo —SH de la fosfopanteteína de la ACP ahora desocupado **(Fig. 21–7)**. La condensación tiene lugar cuando el grupo butirilo, que actúa exactamente igual que el grupo acetilo en el primer ciclo, se une a dos carbonos del grupo malonil-ACP con la pérdida concomitante de CO_2. El producto de esta condensación es un grupo acilo de seis carbonos, unido covalentemente al grupo —SH de la fosfopanteteína. Su grupo β-ceto se reduce en las tres etapas siguientes del ciclo de la sintasa produciendo el grupo acilo saturado, exactamente igual que en la primera vuelta de reacciones, pero en este caso formando un producto de seis carbonos.

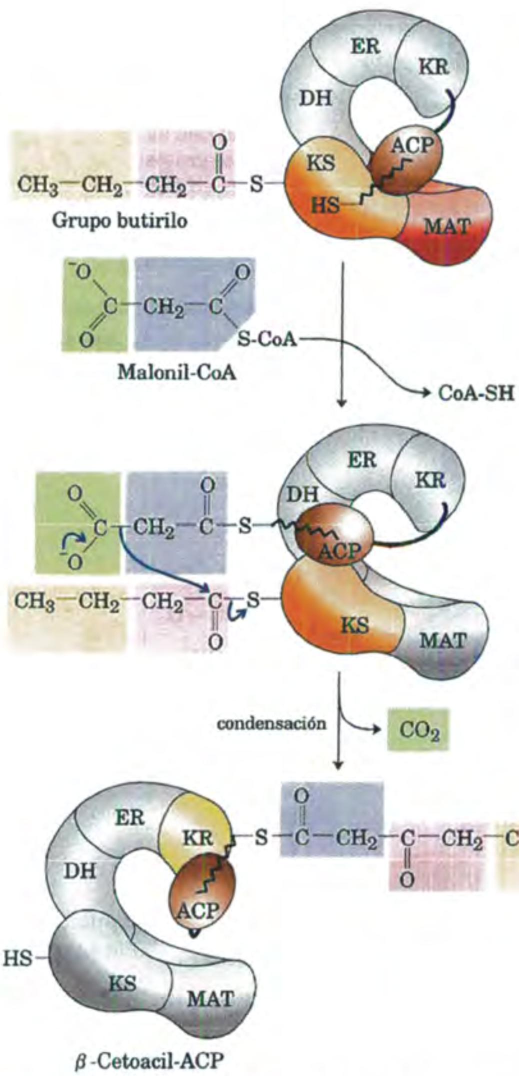


FIGURA 21–7 Inicio de la segunda vuelta del ciclo de la síntesis de ácidos grasos. El grupo butirilo se encuentra sobre el grupo Cys—SH. El grupo malonilo entrante se une primero al grupo —SH de la fosfopanteteína. A continuación, en el paso de condensación, el grupo butirilo completo unido al grupo —SH de la Cys es intercambiado por el grupo carboxilo del residuo malonilo, que se pierde como CO_2 (verde). Este paso es análogo al paso ① de la Figura 21–6. El producto, un grupo β-cetoacilo de seis carbonos, contiene ahora cuatro carbonos procedentes del malonil-CoA y dos procedentes del acetil-CoA que comenzó la reacción. El grupo β-cetoacilo pasa ahora a través de los pasos ② a ④, como en la Figura 21–6.

Siete ciclos de condensación y reducción producen el grupo saturado palmitilo de 16 carbonos, aún unido a la ACP. Por razones no bien conocidas, el alargamiento de la cadena por el complejo de la sintasa se detiene generalmente en este punto, liberándose palmitato libre de la molécula de ACP por acción de una actividad hidrolítica (tioesterasa; TE) en la proteína multifuncional.

La reacción global para la síntesis de palmitato a partir de acetil-CoA se puede separar en dos partes. Primero la formación de siete moléculas de malonil-CoA:

$$7\ \text{Acetil-CoA} + 7CO_2 + 7ATP \rightarrow 7\ \text{malonil-CoA} + 7ADP + 7P_i \qquad (21\text{–}1)$$

a continuación siete ciclos de condensación y reducción:

$$\text{Acetil-CoA} + 7\ \text{malonil-CoA} + 14NADPH + 14H^+ \rightarrow \text{palmitato} + 7CO_2 + 8\ \text{CoA} + 14NADP^+ + 6H_2O \qquad (21\text{–}2)$$

Observe que sólo se producen seis moléculas netas de agua, ya que una se utiliza para hidrolizar el enlace tioéster del palmitato con el enzima. El proceso global (suma de las ecuaciones 21-1 y 21-2) es

$$8\ \text{Acetil-CoA} + 7\ ATP + 14NADPH + 14H^+ \rightarrow \text{palmitato} + 8\ \text{CoA} + 7ADP + 7P_i + 14NADP^+ + 6H_2O \qquad (21\text{–}3)$$

La biosínteis de ácidos grasos tales como el palmitato requiere por tanto acetil-CoA y el aporte de energía química en dos formas: el potencial de transferencia de grupo del ATP y el poder reductor del NADPH. Se requiere el ATP para unir CO_2 al acetil-CoA, produciendo malonil-CoA: el NADPH se requiere para reducir los dobles enlaces.

En los eucariotas no fotosintéticos existe un coste adicional en la síntesis de ácidos grasos debido a que el acetil-CoA se genera en la mitocondria y se ha de transportar al citosol. Tal como veremos esta etapa adicional consume dos ATP por molécula de acetil-CoA transportado, lo que aumenta el coste energético de la síntesis de ácidos grasos a tres ATP por unidad de dos carbonos.

La síntesis de ácidos grasos se produce en el citosol de muchos organismos pero en las plantas tiene lugar en los cloroplastos

En la mayoría de eucariotas superiores el complejo de la ácido graso sintasa se encuentra exclusivamente en el citosol **(Fig. 21–8)**, al igual que los enzimas biosintéticos de los nucleótidos, los aminoácidos y la glucosa. Esta localización separa los procesos sintéticos de las reacciones degradativas, muchas de las cuales tienen lugar en la matriz mitocondrial. Existe una separación similar entre los cofactores transportadores de electrones para el anabolismo (generalmente un proceso reductor) y para el catabolismo (generalmente oxidativo).

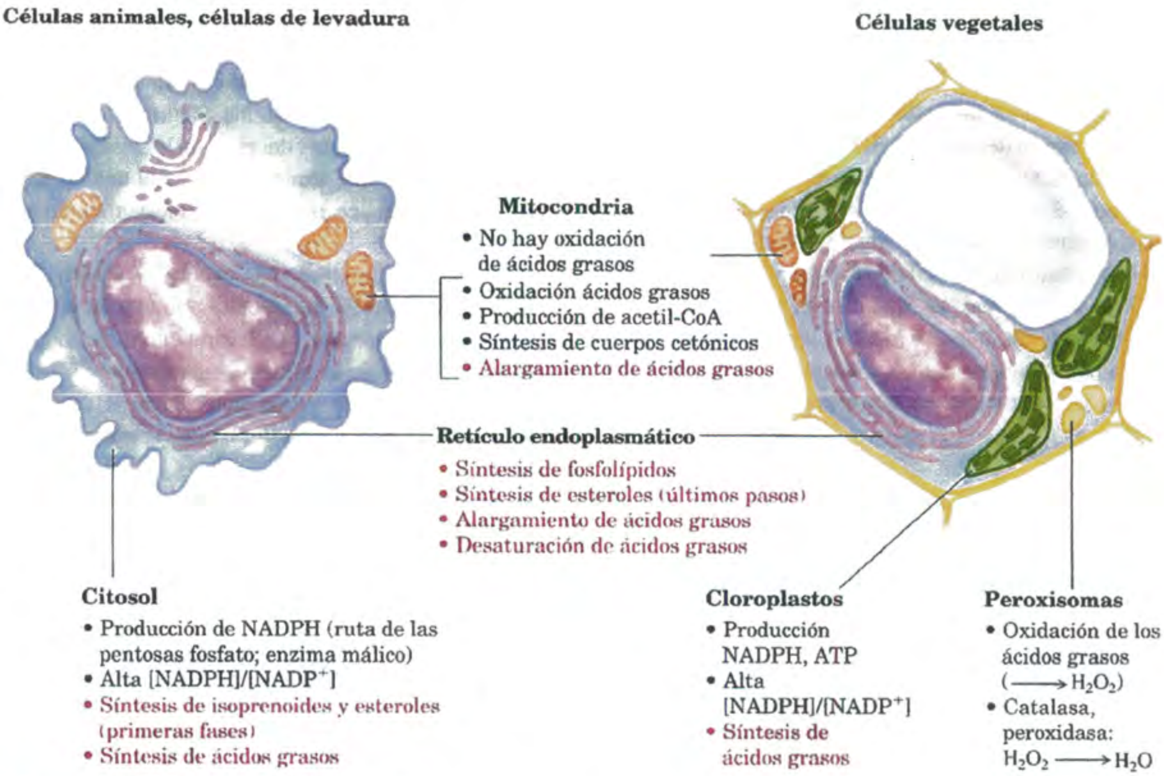


FIGURA 21–8 Localización subcelular del metabolismo lipídico. Las levaduras y las células de animales vertebrados difieren de las células de plantas superiores en la compartimentación del metabolismo lipídico. La síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el compartimiento en el que se puede obtener NADPH para la síntesis reductora (es decir, donde la razón [NADPH]/[NADP$^+$] es alta): el citosol en animales y levaduras y el cloroplasto en las plantas. En este capítulo se discuten los procesos señalados en rojo.

Normalmente el NADPH es el transportador de electrones para las reacciones anabólicas, mientras que el NAD$^+$ actúa en las reacciones catabólicas. En los hepatocitos, la razón [NADPH]/[NADP$^+$] es muy elevada (alrededor de 75) en el citosol, lo que confiere un ambiente fuertemente reductor para la síntesis reductora de ácidos grasos y otras biomoléculas. Debido a que la razón citosólica [NADH]/[NAD$^+$] es mucho menor (alrededor de sólo 8×10^{-4}), el catabolismo oxidativo de la glucosa dependiente de NAD$^+$ puede transcurrir en el mismo compartimiento y al mismo tiempo que la síntesis de ácidos grasos. La razón [NADH]/[NAD$^+$] dentro de la mitocondria es mucho más elevada que en el citosol debido al flujo de electrones hacia el NAD$^+$ procedentes de la oxidación de los ácidos grasos, aminoácidos, piruvato y acetil-CoA. Esta elevada razón [NADH]/[NAD$^+$] mitocondrial favorece la reducción del oxígeno vía cadena respiratoria.

En los hepatocitos y adipocitos el NADPH citosólico está generado principalmente por la vía de las pentosas fosfato (véase la Fig. 14–21) y por el **enzima málico (Fig. 21–9a)**. El enzima málico ligado al NADP que opera en la ruta de asimilación de carbono de las plantas C_4 (véase la Fig. 20–23) no está funcionalmente relacionado. El piruvato producido en la reacción mostrada en la Fig. 21–9a vuelve a entrar en la mitocondria. En hepatocitos y en la glándula mamaria de animales en período de lactancia, el NADPH requerido para la biosíntesis de ácidos grasos es suministrado principalmente por la ruta de las pentosas fosfato (Fig. 21–9b).

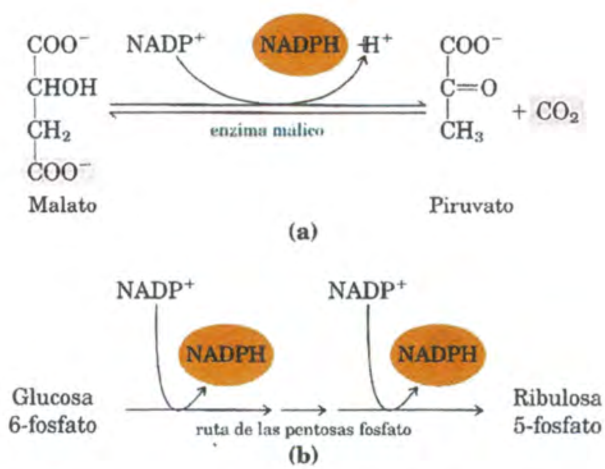


FIGURA 21–9 Producción de NADPH. Dos rutas para obtener NADPH catalizadas por **(a)** enzima málico y **(b)** ruta de las pentosas fosfato.

En las células fotosintéticas de las plantas, la síntesis de ácidos grasos no tiene lugar en el citosol, sino en el estroma de los cloroplastos (Fig. 21–8). Esta localización tiene sentido, ya que el NADPH es producido en los cloroplastos por las reacciones luminosas de la fotosíntesis:

$$H_2O + NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} \tfrac{1}{2}O_2 + NADPH + H^+$$

Aquí también la razón [NADPH]/[$NADP^+$] elevada resultante proporciona el ambiente reductor que favorece los procesos anabólicos reductores tales como la síntesis de ácidos grasos.

El acetato sale de la mitocondria en forma de citrato

En los eucariotas no fotosintéticos casi todo el acetil-CoA utilizado en la síntesis de ácidos grasos se forma en la mitocondria a partir de la oxidación del piruvato y el catabolismo de los esqueletos carbonados de los aminoácidos. El acetil-CoA que se produce en la oxidación de los ácidos grasos no representa una fuente significativa de acetil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos en los animales, ya que las dos rutas están reguladas recíprocamente tal como se describe más adelante.

Debido a que la membrana mitocondrial interna es impermeable al acetil-CoA, una lanzadera indirecta transfiere equivalentes de grupo acetilo a través de la membrana interna (**Fig. 21–10**). El acetil-CoA intramitocondrial reacciona primero con el oxolacetato, formando citrato en la reacción del ciclo del ácido cítrico catalizada por la **citrato sintasa** (véase la Fig. 16–7). El citrato pasa entonces al citosol a través de la membrana mitocondrial interna mediante el **transportador de citrato.** En el citosol, la rotura del citrato por la **citrato liasa** regenera acetil-CoA y oxalacetato en una reacción dependiente de ATP. El oxalacetato no puede volver a la matriz mitocondrial directamente ya que no hay ningún transportador de oxalacetato. En su lugar la malato deshidrogenasa citosólica reduce el oxalacetato a malato, que puede volver a la matriz mitocondrial a través del transportador malato–α-cetoglutarato en intercambio con citrato. En la matriz el malato se reoxida a oxalacetato para completar el intercambio. No obstante, la mayor parte del malato producido en el citosol se utiliza para generar NADPH citosólico mediante la actividad del enzima málico (Fig. 21–9a). El piruvato producido se transporta a la mitocondria por el transportador de piruvato (Fig. 21–10) y se vuelve a convertir en oxalacetato por la piruvato carboxilasa de la matriz. El ciclo

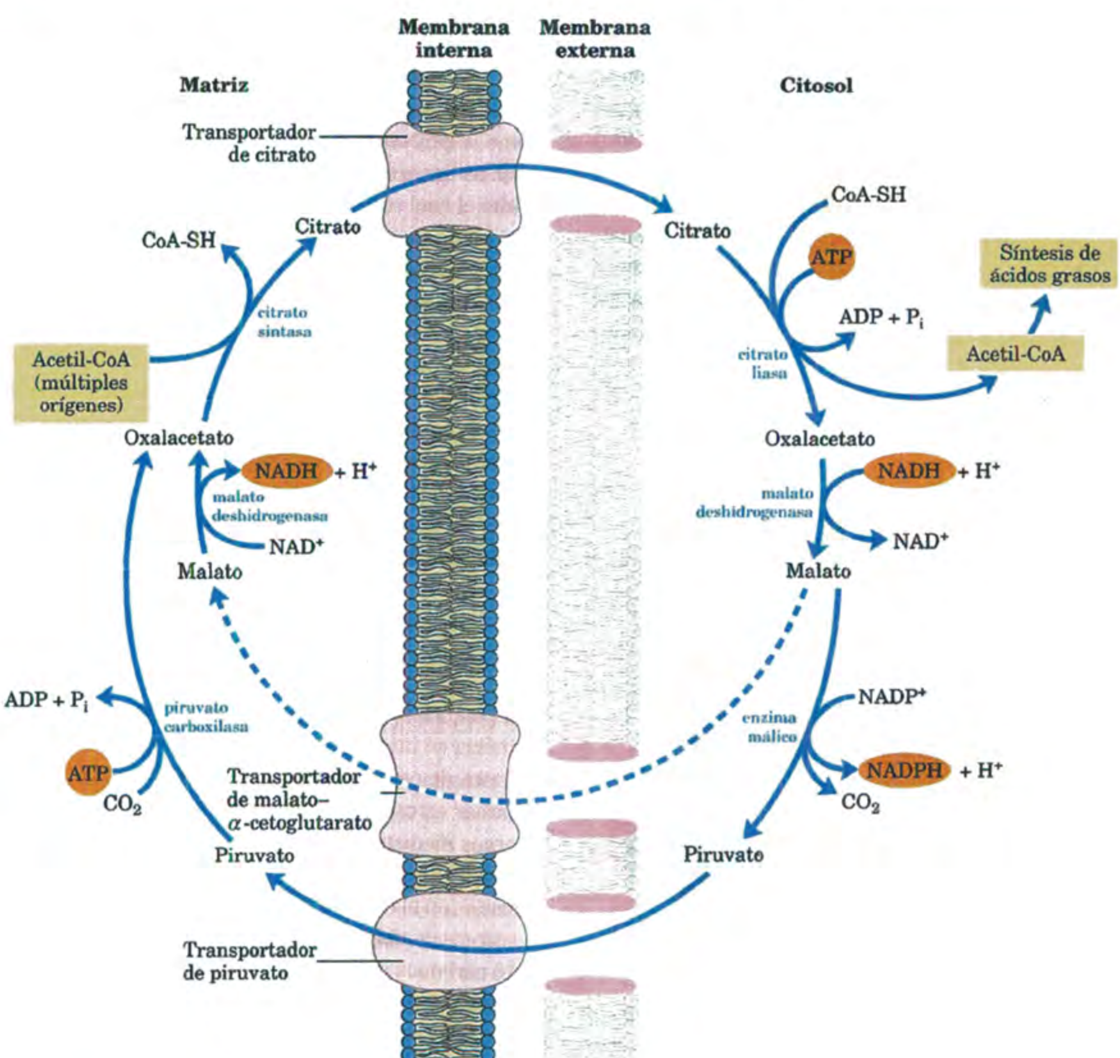


FIGURA 21–10 Lanzadera para la transferencia de grupos acetilo desde la mitocondria hasta el citosol. La membrana externa mitocondrial es libremente permeable a todos estos compuestos. El piruvato procedente del catabolismo de los aminoácidos en la matriz mitocondrial, o de la glucosa por la glucólisis en el citosol, se convierte en acetil-CoA en la matriz. Los grupos acetilo salen de la mitocondria en forma de citrato; en el citosol se liberan en forma de acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos. El oxalacetato se reduce a malato, que puede volver a la matriz mitocondrial y se convierte en oxalacetato. El destino principal del malato citosólico es la oxidación por el enzima málico para generar NADPH citosólico; el piruvato producido vuelve a la matriz mitocondrial.

resultante da lugar al consumo de dos ATP (por la citrato liasa y la piruvato carboxilasa) por cada molécula de acetil-CoA suministrado para la síntesis de ácidos grasos. Después de la rotura del citrato para generar acetil-CoA, la conversión de los cuatro carbonos restantes a piruvato y CO_2 vía el enzima málico genera alrededor de la mitad del NADPH requerido para la síntesis de ácidos grasos. La ruta de las pentosas fosfato contribuye al resto de NADPH necesario.

La biosíntesis de ácidos grasos está perfectamente regulada

Cuando una célula o un organismo dispone de más combustible metabólico del requerido para sus necesidades energéticas, el exceso se convierte generalmente en ácidos grasos que se almacenan en forma de lípidos tales como los triacilgliceroles. La reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa es el paso limitante de la velocidad en la biosíntesis de los ácidos grasos, siendo este enzima un importante sitio de regulación. En los vertebrados el palmitil-CoA, el principal producto de la síntesis de ácidos grasos, actúa como retroinhibidor de este enzima, mientras que el citrato es un activador alostérico que aumenta la V_{max} **(Fig. 21–11a)**. El citrato desempeña un papel central en la desviación del metabolismo celular desde el consumo (oxidación) del combustible metabólico hacia su almacenamiento en forma de ácidos grasos. Cuando existe un aumento en las concentraciones mitocondriales de acetil-CoA y de ATP, el citrato se transporta fuera de la mitocondria; allí, éste último se convierte entonces tanto en un precursor de acetil-CoA citosólico como en una señal alostérica para la activación de la acetil-CoA carboxilasa. Al mismo tiempo, el citrato inhibe la actividad de la fosfofructoquinasa-1 (véase la Fig. 15–14), reduciendo de esta manera el flujo de carbono a través de la glucólisis.

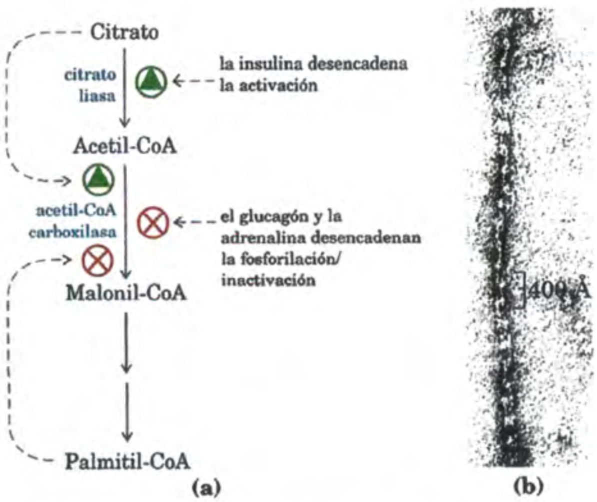


FIGURA 21–11 Regulación de la síntesis de ácidos grasos. (a) En las células de los vertebrados, tanto la regulación alostérica como la modificación covalente dependiente de hormonas influyen en el flujo de precursores hasta malonil-CoA. En las plantas, la acetil-CoA carboxilasa se activa por los cambios en $[Mg^{2+}]$ y pH que acompañan la iluminación (no se muestran aquí). **(b)** Filamentos de acetil-CoA carboxilasa (en la forma activa, desfosforilada) tal como se ven por microscopia electrónica.

La acetil-CoA carboxilasa está también regulada por modificación covalente. La fosforilación, desencadenada por las hormonas glucagón y adrenalina, inactiva el enzima, con lo que reduce su sensibilidad a la activación por citrato, lo que hace que la síntesis de ácidos grasos sea más lenta. En su forma activa (desfosforilada), la acetil-CoA carboxilasa se polimeriza dando lugar a filamentos largos (Fig. 21–11b); la fosforilación va acompañada de la disociación en subunidades monoméricas con pérdida de actividad.

La acetil-CoA carboxilasa de plantas y bacterias no está regulada por el citrato o por un ciclo de fosforilación-desfosforilación. El enzima vegetal es activado por un incremento del pH y la $[Mg^{2+}]$ en el estroma, procesos ambos que se producen cuando se ilumina la planta (véase la Fig. 20–17). Las bacterias no utilizan triacilgliceroles como almacenamiento de energía. El papel principal de la síntesis de ácidos grasos en *E. coli* es proporcionar precursores para los lípidos de membrana; la regulación de este proceso es compleja, interviniendo nucleótidos de guanina (tales como el ppGpp) que coordinan el crecimiento celular con la formación de membranas (véanse las Figs. 8–39 y 28–24).

Además de la regulación de la actividad enzimática de manera continua, estas rutas metabólicas están reguladas a nivel de la expresión génica. Por ejemplo, cuando los animales ingieren un exceso de ciertos ácidos grasos poliinsaturados se suprime la expresión de genes que codifican un amplio grupo de enzimas lipogénicos en el hígado. El mecanismo detallado mediante el cual se regulan estos genes todavía no está claro.

Si la síntesis y la β-oxidación de los ácidos grasos tuviesen lugar simultáneamente, los dos procesos constituirían un ciclo inútil, malgastando energía. Ya observamos anteriormente (véase la Fig. 17–12) que el malonil-CoA bloquea la β-oxidación al inhibir la carnitina aciltransferasa I. Así, durante la síntesis de ácidos grasos la producción del primer intermediario, el malonil-CoA detiene la β-oxidación al nivel del sistema de transporte en la membrana mitocondrial interna. Este mecanismo de control ilustra otra ventaja para la célula de la separación de rutas sintéticas y degradativas en diferentes compartimientos celulares.

Los ácidos grasos saturados de cadena larga se sintetizan a partir del palmitato

El palmitato, producto principal del sistema de la ácido graso sintasa en las células animales, es el precursor de otros ácidos grasos de cadena larga **(Fig. 21–12)**. Puede ser alargado para formar estearato (18:0) o incluso ácidos grasos saturados más largos mediante adiciones sucesivas de grupos acetilo, por acción de los **sistemas de alargamiento de ácidos grasos** presentes en el retículo endoplasmático liso y en la mitocondria. El sistema de alargamiento más activo en el RE alarga la cadena de 16 carbonos del palmitil-CoA con dos carbonos, dando lugar al estearil-CoA. Aunque intervienen diferentes sistemas enzimáticos y el coenzima A es el transportador de acilos en la reacción en lugar de la ACP, el mecanismo de alargamiento en el RE es, por lo demás, idéntico al de la síntesis del palmitato: donación de dos carbonos por el malonil-CoA, seguido de reducción, deshidratación y reducción para dar el producto saturado de 18 carbonos, el estearil-CoA.

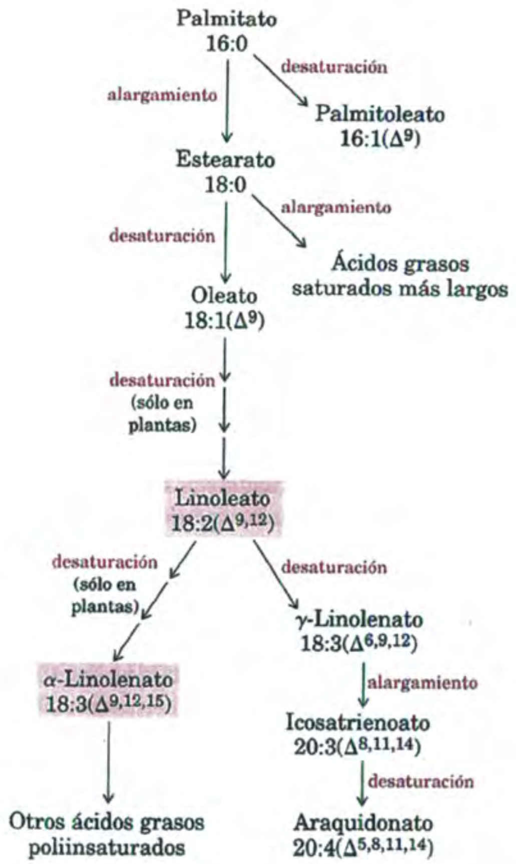


FIGURA 21–12 Rutas de síntesis de otros ácidos grasos. El palmitato es el precursor del estearato y otros ácidos grasos de cadena más larga, así como de los ácidos grasos monoinsaturados palmitoleato y oleato. Los mamíferos no pueden convertir el oleato en linoleato o α-linolenato (sombreados en rosa), por lo que son requeridos en la dieta como ácidos grasos esenciales. Se esquematiza la conversión del linoleato en otros ácidos grasos poliinsaturados e icosanoides. Los ácidos grasos insaturados se simbolizan indicando el número de carbonos y el número y posición de los dobles enlaces, según la Tabla 10–1.

La desaturación de los ácidos grasos necesita una oxidasa de función mixta

El palmitato y el estearato son los precursores de los dos ácidos grasos monoinsaturados más abundantes en los tejidos animales: el palmitoleato, 16:1(Δ^9), y el oleato, 18:1(Δ^9). Estos ácidos grasos tienen un único doble enlace *cis* entre C-9 y C-10 (véase la Tabla 10–1). El doble enlace es introducido en la cadena del ácido graso mediante una reacción oxidativa catalizada por la **acil graso–CoA desaturasa (Fig. 21–13)**, una **oxidasa de función mixta** (Recuadro 21–1). Dos sustratos diferentes, el ácido graso y el NADH o el NADPH, experimentan simultáneamente oxidaciones de dos electrones. La ruta del flujo electrónico incluye un citocromo (citocromo b_5) y una flavoproteína (citocromo b_5 reductasa) que, al igual que la acil graso-CoA desaturasa, están presentes en el RE liso. Las bacterias tienen dos citocromo b_5 reductasas, una dependiente de NADH y la otra de NADPH; no está claro cuál de los dos es el principal dador in vivo. En las plantas, el oleato se produce en el estroma del cloroplasto por una estearil-ACP desaturasa que utiliza ferredoxina como dador de electrones.

Los hepatocitos de mamífero pueden introducir fácilmente dobles enlaces en la posición Δ^9 de los ácidos grasos, pero no pueden introducir dobles enlaces adicionales entre el C-10 y el extremo metilo terminal. Así, los mamíferos no pueden sintetizar linoleato, 18:2 ($\Delta^{9,12}$) ni α-linolenato 18:3 ($\Delta^{9,12,15}$), aunque ambos pueden ser sintetizados por las plantas. Las desaturasas que introducen dobles enlaces en las posiciones Δ^{12} y Δ^{15} están localizadas en el RE y los cloroplastos. Los enzimas del RE no actúan sobre los ácidos grasos libres sino sobre un fosfolípido, la fosfatidilcolina, que contiene al menos un oleato unido al glicerol **(Fig. 21–14)**. Tanto las plantas como las bacterias deben sintetizar ácidos grasos poliinsaturados para asegurar la fluidez de la membrana a bajas temperaturas.

Debido a que son precursores necesarios para la síntesis de otros productos, el linoleato y el α-linolenato son **ácidos grasos esenciales** para los mamíferos; deben ser obtenidos a partir de materiales vegetales en la dieta. Una vez ingerido, el li-

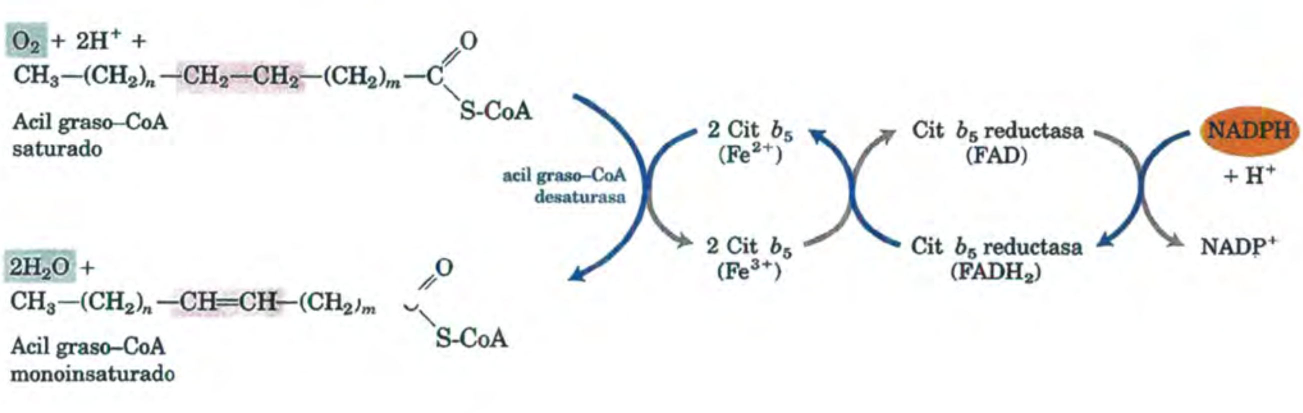


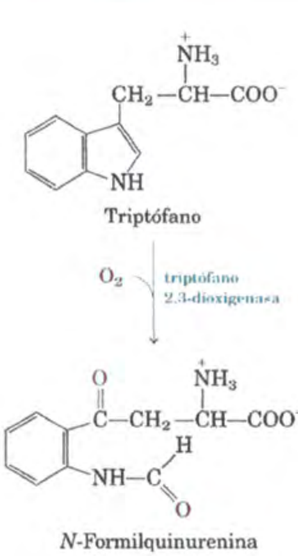
FIGURA 21–13 Transferencia de electrones en la desaturación de ácidos grasos en los vertebrados. Las flechas azules muestran la ruta de los electrones cuando dos sustratos, un acil graso–CoA y NADPH, son oxidados por el oxígeno molecular. Estas reacciones se dan en la cara de la luz del RE liso. Una ruta similar, pero con transportadores de electrones diferentes, tiene lugar en las plantas.

RECUADRO 21-1 Oxidasas de función mixta, oxigenasas y citocromo P-450

En este capítulo nos encontramos con varios enzimas que llevan a cabo reacciones de oxidación-reducción en las que interviene el oxígeno molecular. Una de estas reacciones es la que introduce un doble enlace en una cadena acilo graso (véase la Fig. 21-13).

La nomenclatura de los enzimas que catalizan reacciones de este tipo general es a menudo confusa para los estudiantes, al igual que el mecanismo de las reacciones. **Oxidasa** es el nombre general para los enzimas que catalizan oxidaciones en las que el oxígeno molecular es el aceptor de electrones aunque los átomos de oxígeno no aparezcan en el producto oxidado (aunque, tal como veremos, ¡hay una excepción a esta "regla"!). El enzima que genera un doble enlace en el acil graso–CoA durante la oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas (véase la Fig. 17-13) es una oxidasa de este tipo; un segundo ejemplo es la citocromo oxidasa de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (véase la Fig. 19-14). En el primer caso, la transferencia de dos electrones al H_2O produce peróxido de hidrógeno, H_2O_2; en el segundo, dos electrones reducen $\frac{1}{2}O_2$ a H_2O. Una gran parte de las oxidasas, aunque no todas, son flavoproteínas.

Las **oxigenasas** catalizan reacciones oxidativas en las que átomos de oxígeno *se* incorporan directamente a la molécula de sustrato formando, por ejemplo, un nuevo grupo hidroxilo o carboxilo. Las **dioxigenasas** catalizan reacciones en las que los dos átomos de oxígeno del O_2 se incorporan en la molécula orgánica de sustrato. Un ejemplo de dioxigenasa es la triptófano 2,3-dioxigenasa que cataliza la apertura del anillo pentaatómico del triptófano en el catabolismo de este aminoácido. Cuando esta reacción tiene lugar en presencia de $^{18}O_2$, los átomos de oxígeno isotópico se encuentran en los dos grupos carbonilo del producto (en rojo):



Las **monooxigenasas**, que son enzimas más abundantes y complejos en su acción, catalizan reacciones en las que sólo uno de los dos átomos de oxígeno del O_2 se incorpora al sustrato orgánico, mientras que el otro es reducido a H_2O. Las monooxigenasas requieren dos sustratos que actúan como reductores de los dos átomos de oxígeno del O_2. El sustrato principal acepta uno de los dos átomos de oxígeno del O_2, mientras que un cosustrato aporta átomos de hidrógeno para reducir el segundo átomo de oxígeno a H_2O. La ecuación general de las monooxigenasas es

$$AH + BH_2 + O{-}O \rightarrow A{-}OH + B + H_2O$$

en donde AH es el sustrato principal y BH_2 el cosustrato. Debido a que la mayoría de monooxigenasas catalizan reacciones en las que se hidroxila el sustrato principal, también se denominan **hidroxilasas.** A veces también se las denomina **oxidasas de función mixta** u **oxigenasas de función mixta,** para indicar que oxidan simultáneamente dos sustratos diferentes. (Obsérvese aquí el uso de "oxidasa", una desviación del significado general de este término antes indicado.)

Hay diferentes clases de monooxigenasas según la naturaleza del cosustrato. Algunas utilizan nucleótidos de flavina reducidos ($FMNH_2$ o $FADH_2$), otras usan NADH o NADPH y unas terceras utilizan α-cetoglutarato como cosustrato. El enzima que hidroxila el anillo fenilo de la fenilalanina para dar tirosina es una monooxigenasa que utiliza tetrahidrobiopterina como cosustrato (véase la Fig. 18-23). Éste es el enzima defectuoso en la enfermedad genética humana fenilcetonuria.

Las reacciones de monooxigenación más numerosas y complejas son las que emplean un tipo de proteína hemo denominada **citocromo P-450.** Este citocromo se encuentra normalmente presente en el RE liso y no en la mitocondria. Al igual que la citocromo oxidasa mitocondrial, el citocromo P-450 puede reaccionar con O_2 y unir monóxido de carbono, pero se diferencia de la citocromo oxidasa en que el complejo con el monóxido de carbono en su forma reducida absorbe la luz intensamente a 450 nm; este es el motivo por el cual se denomina P-450.

El citocromo P-450 cataliza reacciones de hidroxilación en las que un sustrato orgánico RH se hidroxila a R—OH, incorporando un átomo de oxígeno del O_2; el otro átomo de oxígeno se reduce a H_2O por acción de equivalentes de reducción aportados por el NADH o el NADPH pero que normalmente pasan al citocromo P-450 mediante una proteína ferro-sulfurada. La Figura 1 muestra un esquema simplificado de la acción del citocromo P-450, en la que hay pasos intermedios no totalmente caracterizados.

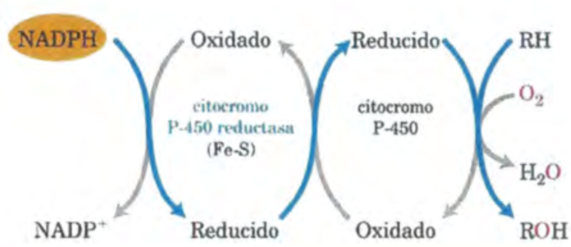


FIGURA 1

El citocromo P-450 es, en realidad, una familia de proteínas similares; se conocen varios cientos de miembros de esta familia proteica, cada uno con una especificidad de sustrato diferente. En la corteza suprarrenal, por ejemplo, un citocromo P-450 específico participa en la hidroxilación de esteroides para producir hormonas adrenocorticales (véase la Fig. 21–46). El citocromo P-450 es también importante en la hidroxilación de muchos tipos diferentes de fármacos, tales como los barbituratos y otros xenobióticos (sustancias extrañas al organismo), especialmente si son hidrofóbicos y relativamente insolubles. El carcinógeno ambiental benzo[*a*]pireno (que se encuentra en el humo del tabaco) es hidroxilado por el citocromo P-450 durante su destoxificación. La hidroxilación de los xenobióticos los hace más hidrosolubles, lo que permite su excreción en la orina. Por desgraciada, la hidroxilación de algunos compuestos los convierte en sustancias tóxicas, con lo que se subvierte el sistema de destoxificación.

Reacciones descritas en este capítulo que son catalizadas por oxidasas de función mixta son las que intervienen en la desaturación del acil graso-CoA (Fig. 21–13), en la síntesis de leucotrienos (Fig. 21–16), en la síntesis de plasmalógenos (Fig. 21–30), conversión del escualeno en colesterol (Fig. 21–37) y en la síntesis de hormonas esteroideas (Fig. 21–47).

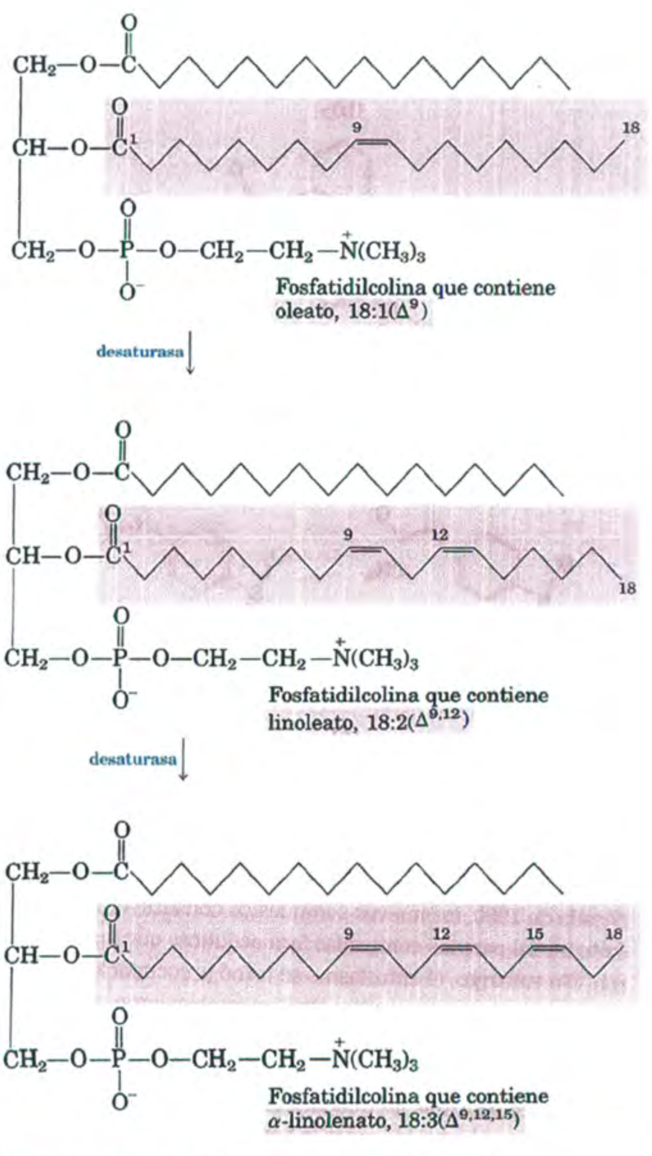


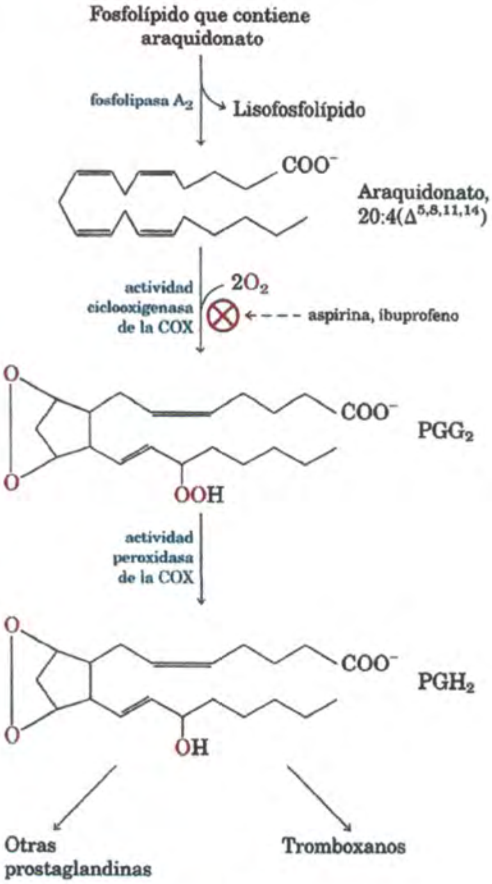
FIGURA 21–14 Acción de las desaturasas vegetales. Las desaturasas vegetales oxidan el oleato unido a la fosfatidilcolina, produciendo ácidos grasos poliinsaturados. Algunos de los productos se liberan de la fosfatidilcolina por hidrólisis.

noleato puede convertirse en otros ácidos grasos poliinsaturados, especialmente γ-linolenato, icosatrienoato y araquidonato (icosatetraenoato), que pueden producirse todos ellos a partir del linoleato (Fig. 21–12). El araquidonato, 20:4($\Delta^{5,8,11,14}$), es un precursor esencial de lípidos reguladores, los icosanoides. Los ácidos grasos de 20 carbonos se sintetizan a partir del linoleato (y del α-linolenato) mediante reacciones de alargamiento de ácidos grasos análogas a las descritas en la página 814.

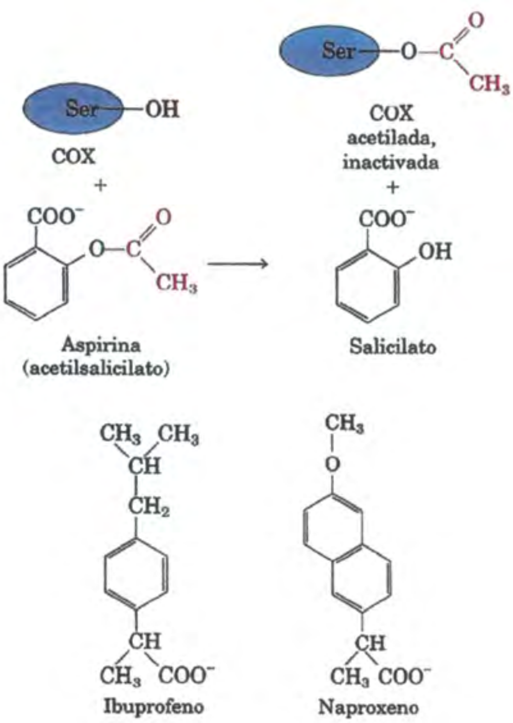
Los icosanoides se forman a partir de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos

Los icosanoides son una familia de moléculas de señalización biológica muy potentes que actúan como mensajeros de corto alcance y que afectan a tejidos cercanos a las células que los producen. En respuesta a estímulos hormonales o de otro tipo la fosfolipasa A_2, presente en la mayor parte de células de mamífero, ataca los fosfolípidos de membrana liberando araquidonato del carbono central del glicerol. A continuación, enzimas del RE liso convierten el araquidonato en **prostaglandinas,** empezando con la formación de prostaglandina H_2 (PGH_2), que es el precursor inmediato de otras muchas prostaglandinas y de los tromboxanos **(Fig. 21–15a)**. Las dos reacciones que dan lugar a PGH_2 están catalizadas por un enzima bifuncional, la **ciclooxigenasa (COX),** también denominada **prostaglandina H_2 sintasa.** En el primero de estos dos pasos, la actividad ciclooxigenasa introduce oxígeno molecular para convertir el araquidonato en PGG_2. El segundo paso, catalizado por la actividad peroxidasa de la COX, convierte PGG_2 en PGH_2.

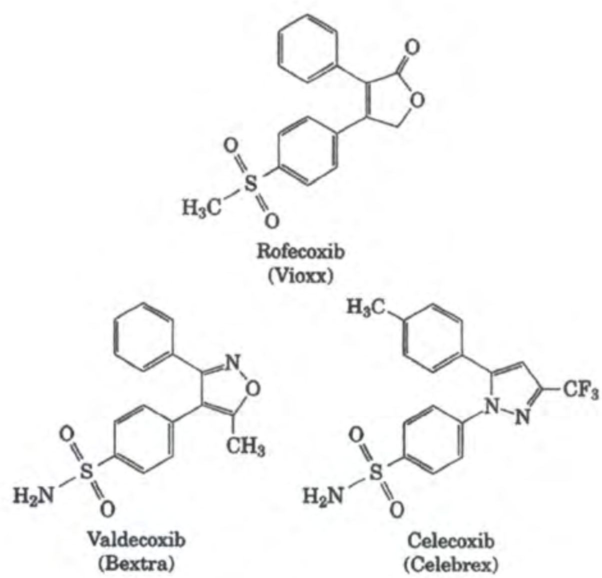
Los mamíferos tienen dos isozimas de la prostaglandina H_2 sintasa, la COX-1 y la COX-2. Los dos isozomas tienen funciones diferentes pero secuencias de aminoácidos muy parecidas (60 a 65% de identidad de secuencia) y mecanismos de reacción similares en sus dos sitios catalíticos. La COX-1 es responsable de la síntesis de las prostaglandinas que regulan la secreción de mucina gástrica, mientras que por su parte la COX-2 sintetiza las prostaglandinas que intervienen en la inflamación, el dolor y la fiebre.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 21–15 Ruta "cíclica" desde el araquidonato hasta las prostaglandinas y los tromboxanos. **(a)** Después de la liberación del araquidonato de los fosfolípidos por acción de la fosfolipasa A_2, las actividades ciclooxigenasa y peroxidasa de la COX (también denominada prostaglandina H_2 sintasa) catalizan la producción de PGH_2, el precursor de otras prostaglandinas y los tromboxanos. **(b)** La aspirina inhibe la primera reacción acetilando un residuo Ser esencial en el enzima. El ibuprofeno y el naproxeno inhiben el mismo paso, probablemente imitando la estructura del sustrato o de un intermedio de la reacción. **(c)** Inhibidores de la ciclooxigenasa específicos de la COX-2 utilizados como analgésicos (véase el texto).

Se puede aliviar el dolor inhibiendo la COX-2. El primer medicamento que fue comercializado a gran escala para este fin fue la aspirina (acetilsalicilato; Fig. 21–15b). El nombre aspirina (de *a* de acetil y *spir* de *Spirsaüre*, palabra alemana utilizada para los salicilatos de la planta *Spiraea ulmaria*) apareció en 1899, año de introducción de este fármaco por la compañía Bayer. La aspirina inactiva irreversiblemente la actividad ciclooxigenasa de los dos isozimas COX al acetilar un residuo Ser y bloquear el sitio activo de cada enzima, lo que inhibe, por tanto, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. El ibuprofeno, fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID, "non-esteroidal antiinflammatory drugs"; Fig. 21–15b) muy utilizado, inhibe el mismo par de enzimas. No obstante, la inhibición de COX-1 puede tener efectos secundarios indeseables, entre los que se incluyen irritación del estómago y otras consecuencias más graves. En la década de 1990 y como consecuencia del descubrimiento de las estructuras cristalinas de COX-1 y COX-2 se desarrollaron compuestos NSAID con una mayor especificidad hacia COX-2 como terapias avanzadas contra el dolor grave. Se aprobaron tres medicamentos de este tipo para uso a escala global: rofecoxib (Vioxx), valdecoxib (Bextra) y celecoxib (Celebrex) (Fig. 21–15c). Puestos en el mercado a finales de la década de 1990, los nuevos compuestos constituyeron un gran éxito inicial para las compañías farmacéuticas que los produjeron. Sin embargo, el entusiasmo se tornó preocupación cuando informes de campo y estudios clínicos establecieron conexiones entre los fármacos y un aumento en el riesgo de infarto de miocardio y embolia. No están claras las causas del problema pero se ha especulado que los inhibidores de la COX-2 alteraban el fino equilibrio mantenido entre la hormona prostaciclina, que dilata los vasos sanguíneos impidiendo la formación de coágulos sanguíneos y que es reducida por los inhibidores de la COX-2, y los tromboxanos, producidos por la vía en la que interviene COX-1, que ayudan a formar coágulos de sangre. Vioxx fue reti-

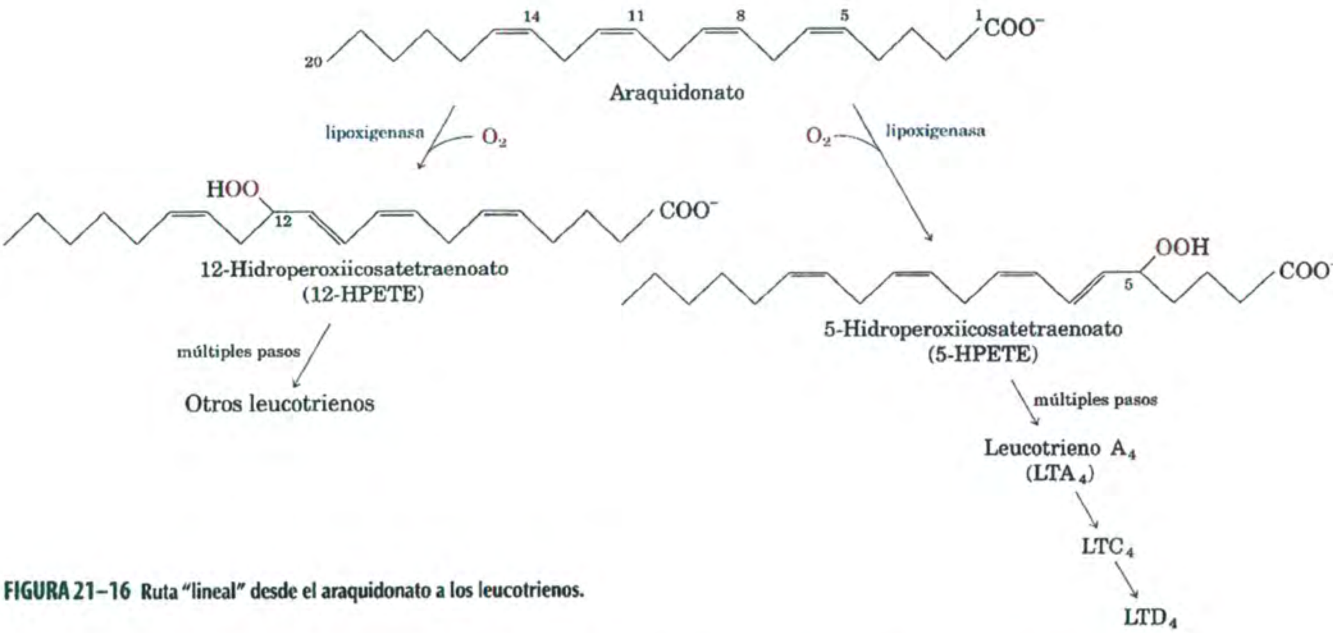


FIGURA 21–16 Ruta "lineal" desde el araquidonato a los leucotrienos.

rado del mercado en 2004 y Betrex poco después. A principios de 2007, Celebrex continuaba en el mercado pero se utiliza con mayores precauciones.

La **tromboxano sintasa** presente en las plaquetas sanguíneas (trombocitos) convierte la PGH_2 en tromboxano A_2, del que derivan otros **tromboxanos** (Fig. 21–15a). Los tromboxanos inducen la constricción de los vasos sanguíneos y la agregación plaquetaria, etapas iniciales de la coagulación de la sangre. Dosis bajas de aspirina tomadas regularmente reducen la probabilidad de ataques de corazón y embolias al reducir la producción de tromboxanos. ■

Los tromboxanos, al igual que las prostaglandinas, contienen un anillo de cinco o seis átomos; la ruta que conduce desde el araquidonato hasta estas dos clases de compuestos es a veces denominada ruta "cíclica", para distinguirla de la ruta "lineal" que, a partir del araquidonato, da lugar a los **leucotrienos,** compuestos lineales **(Fig. 21–16)**. La síntesis de leucotrienos comienza con la acción de varias lipoxigenasas que catalizan la incorporación de oxígeno molecular en el araquidonato. Estos enzimas, que se encuentran en los leucocitos y en el corazón, cerebro, pulmón y bazo, son oxidasas de función mixta que utilizan el citocromo P-450 (Recuadro 21–1). Los distintos leucotrienos difieren en la posición del grupo peróxido introducido por las lipoxigenasas. Esta ruta lineal desde el araquidonato, a diferencia de la ruta cíclica, no es inhibida por la aspirina ni por los otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

Las plantas también producen importantes moléculas de señalización a partir de los ácidos grasos. Al igual que en los animales, un paso clave en el inicio de la señalización implica la activación de una fosfolipasa específica. En las plantas el sustrato ácido graso utilizado es el α-linolenato. Una lipoxigenasa cataliza a continuación el primer paso de una ruta que convierte el linolenato en jasmonato, una sustancia de la que se sabe que tiene funciones específicas de señalización en la defensa contra insectos, la resistencia contra patógenos fúngicos y la maduración del polen. El jasmonato (véase la Fig. 12–32) también afecta la germinación de las semillas, el crecimiento de la raíz y el desarrollo de frutos y semillas.

RESUMEN 21.1 Biosíntesis de ácidos grasos e icosanoides

- Los ácidos grasos saturados de cadena larga se sintetizan a partir del acetil-CoA por un sistema citosólico de seis actividades enzimáticas más una proteína transportadora de acilos (ACP). Hay dos tipos de ácido graso sintasa. La FAS I, que se encuentra en vertebrados y hongos, está formada por polipéptidos multifuncionales. La FAS II es un sistema disociado que se encuentra en bacterias y plantas. Ambas contienen dos tipos de grupos —SH (uno proporcionado por la fosfopanteteína de la ACP y el otro por un residuo Cys del enzima β-cetoacil-ACP sintasa) que funcionan como transportadores de los intermediarios acilo graso.
- El malonil-ACP, formado a partir del acetil-CoA (exportado de la mitocondria) y CO_2, se condensa con un acetilo ligado al —SH de la Cys para dar lugar a acetoacetil-ACP con liberación de CO_2. A ello le sigue la reducción al derivado D-β-hidroxi, su deshidratación al *trans*-Δ^2-acil-ACP insaturado y la reducción a butiril-ACP. En los dos pasos de reducción el NADPH es el dador de electrones. La síntesis de ácidos grasos está regulada al nivel de la formación del malonil-CoA.
- Seis moléculas más de malonil-ACP reaccionan sucesivamente en el extremo carboxilo de la cadena de ácido graso en crecimiento hasta formar palmitil-ACP, producto final de la reacción de la ácido graso sintasa. El palmitato libre se separa por hidrólisis.
- El palmitato se puede alargar para dar el estearato de 18 carbonos. El palmitato y el estearato pueden, a su vez, ser desaturados para dar palmitoleato y oleato, respectivamente, por acción de oxidasas de función mixta.
- Los mamíferos no pueden sintetizar linoleato y deben obtenerlo de fuentes vegetales; convierten el linoleato exógeno en araquidonato, compuesto que da lugar a la familia

de los icosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), con una función señalizadora muy potente. La síntesis de prostaglandinas y tromboxanos es inhibida por los NSAID que actúan sobre la actividad ciclooxigenasa de la protaglandina H_2 sintasa.

21.2 Biosíntesis de triacilgliceroles

La mayor parte de ácidos grasos sintetizados o ingeridos por un organismo tienen uno de estos dos destinos: incorporación en triacilgliceroles para el almacenamiento de energía metabólica o incorporación en los fosfolípidos componentes de las membranas. El reparto entre estos destinos alternativos depende de las necesidades momentáneas del organismo. Durante el crecimiento rápido la síntesis de nuevas membranas requiere la síntesis de fosfolípidos de membrana; los organismos que tienen un aporte excesivo de alimento pero no se encuentran en fase de crecimiento activo desvían la mayor parte de sus ácidos grasos hacia grasas de almacenamiento. Ambas rutas comienzan en el mismo punto: la formación de ésteres acilo graso del glicerol. En esta sección examinaremos la ruta hacia los triacilgliceroles y su regulación, así como la producción de glicerol 3-fosfato en el proceso de la gliceroneogénesis.

Los triacilgliceroles y los glicerofosfolípidos se sintetizan a partir de los mismos precursores

Los animales pueden sintetizar y almacenar grandes cantidades de triacilgliceroles para usarlos más tarde como combustible (véase el Recuadro 17–1). En el ser humano sólo se pueden almacenar unos pocos hectogramos de glucógeno en el hígado y en el músculo, escasamente suficientes para suministrar las necesidades de energía corporal durante 12 horas. En cambio, la cantidad total de triacilglicerol almacenado en un humano medio de 70 kg es de unos 15 kg, suficiente para cubrir sus necesidades energéticas basales durante 12 semanas (véase la Tabla 23–5). Los triacilgliceroles tienen el contenido energético más alto de todos los nutrientes almacenados (más de 38 kJ/g). Cuando la cantidad de glúcidos ingeridos excede la capacidad de almacenamiento de glucógeno por el organismo, el exceso se convierte en triacilgliceroles que se almacenan en el tejido adiposo. Las plantas también producen triacilgliceroles como combustible rico en energía, que se almacena principalmente en frutos y semillas.

En los tejidos animales, los triacilgliceroles y los glicerofosfolípidos tales como la fosfatidiletanolamina comparten dos precursores (acil graso–CoA y L-glicerol 3-fosfato) y varios pasos biosintéticos. La casi totalidad del glicerol 3-fosfato procede de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) generada durante la glucólisis por acción de la **glicerol 3-fosfato deshidrogenasa** citosólica ligada al NAD; en el hígado y el riñón una pequeña cantidad de glicerol 3-fosfato también se forma a partir del glicerol por acción de la **glicerol quinasa** (Fig. 21–17). Los otros precursores de los triacilgliceroles son los acil grasos–CoA formados a partir de ácidos grasos por **acil-CoA sintetasas,** los mismos enzimas responsables de la activación de los ácidos grasos para la β-oxidación (véase la Fig. 17–5).

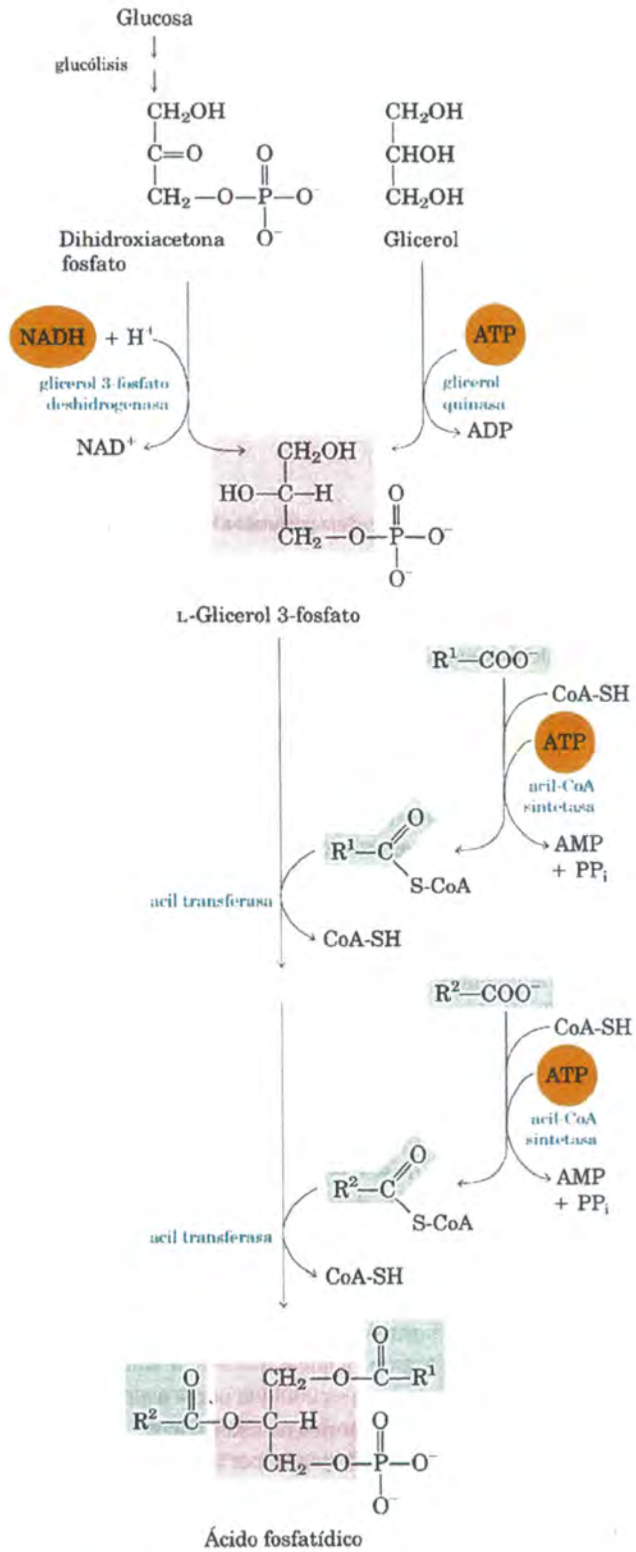


FIGURA 21–17 Biosíntesis del ácido fosfatídico. Se activa un grupo acilo graso mediante formación del acil graso-CoA, que se transfiere a continuación a un enlace éster con el L-glicerol 3-fosfato, formado por cualquiera de las dos vías mostradas. El ácido fosfatídico se muestra aquí con la estereoquímica correcta en el C-2 de la molécula de glicerol. Para conservar espacio en las figuras posteriores (también en la Fig. 21–14), los dos grupos acilo graso de los glicerofosfolípidos y los tres grupos acilo de los triacilgliceroles se muestran proyectándose a la derecha.

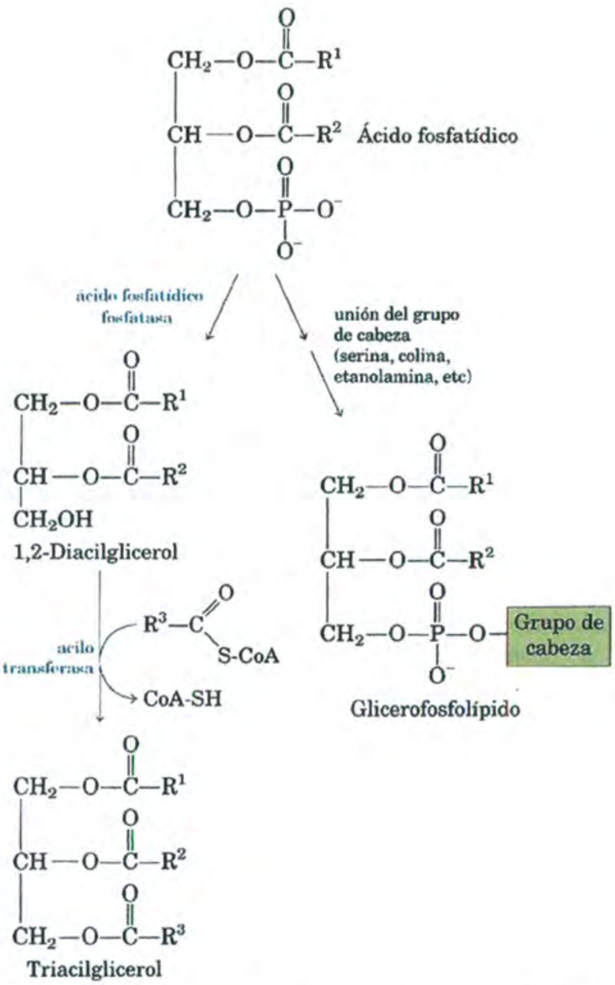


FIGURA 21–18 El ácido fosfatídico en la biosíntesis de lípidos. El ácido fosfatídico es el precursor de los triacilgliceroles y de los glicerofosfolípidos. Los mecanismos de unión del grupo de cabeza en la síntesis de fosfolípidos se describen más adelante en esta sección.

El primer paso en la biosíntesis de triacilgliceroles es la acilación de los dos grupos hidroxilo libres del L-glicerol 3-fosfato por dos moléculas de acil graso-CoA para dar **diacilglicerol 3-fosfato,** más frecuentemente llamado **ácido fosfatídico** o fosfatidato (Fig. 21–17). El ácido fosfatídico se encuentra solamente en cantidades minúsculas en las células, pero es un intermediario crucial en la biosíntesis de lípidos; puede convertirse tanto en triacilglicerol como en glicerofosfolípido. En la ruta de los triacilgliceroles el ácido fosfatídico se hidroliza por la **ácido fosfatídico fosfatasa** y forma 1,2-diacilglicerol **(Fig. 21–18)**. Los diacilgliceroles se convierten seguidamente en triacilgliceroles por transesterificación con un tercer acil graso–CoA.

La biosíntesis de triacilgliceroles en los animales está regulada por hormonas

En los humanos la cantidad de grasa corporal se mantiene relativamente constante durante largos períodos aunque pueden haber cambios a corto plazo poco importantes en función de la fluctuación de la ingestión calórica. Un exceso de consumo de glúcidos, grasas o proteínas por encima de las necesidades energéticas se almacena en forma de triacilgliceroles, que pueden ser utilizados para obtener energía permitiéndole al cuerpo soportar períodos de ayuno.

La biosíntesis y la degradación de triacilgliceroles están reguladas de manera que la ruta favorecida depende de los recursos metabólicos y de las necesidades del momento. La velocidad de biosíntesis de triacilglicerol se altera profundamente por la acción de varias hormonas. La insulina, por ejemplo, promueve la conversión de glúcidos en triacilgliceroles **(Fig. 21–19)**. Las personas con diabetes mellitus grave, debido a la falta de secreción o de acción de la insulina, no sólo no pueden utilizar adecuadamente la glucosa sino que tampoco son capaces de sintetizar ácidos grasos a partir de glúcidos o aminoácidos. Si no se trata la diabetes, estos individuos presentan un aumento de oxidación de las grasas y de la formación de cuerpos cetónicos (Capítulo 17), y en consecuencia pierden peso. ■

Un factor adicional en el equilibrio entre biosíntesis y degradación de triacilgliceroles es que aproximadamente el 75% de todos los ácidos grasos liberados por lipólisis se reesterifican para formar triacilgliceroles y no para ser utilizados como combustible. Esta proporción se mantiene incluso en condiciones de inanición, en las que el metabolismo energético se desvía de la utilización de glúcidos a la oxidación de ácidos grasos. Parte de este reciclado de ácidos grasos se produce en el tejido adiposo y en él la reesterificación tiene lugar antes de la liberación al torrente circulatorios, y parte tiene lugar a través de un ciclo sistémico en el que los ácidos grasos libres se transportan al hígado, se reciclan a triacilglicerol, se exportan de nuevo a la

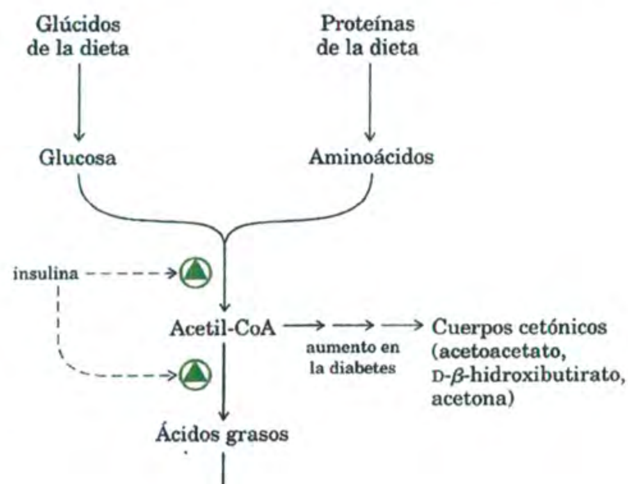


FIGURA 21–19 Regulación de la síntesis de triacilgliceroles por la insulina. La insulina estimula la conversión de los glúcidos y proteínas de la dieta en grasa. Los individuos con diabetes mellitus carecen de insulina; cuando la enfermedad no está controlada, esto provoca una síntesis de ácidos grasos disminuida, y el acetil-CoA procedente del catabolismo de glúcidos y proteínas se desvía hacia la producción de cuerpos cetónicos. Los individuos con cetosis grave huelen a acetona, por lo que este estado se confunde a veces con embriaguez (p. 929).

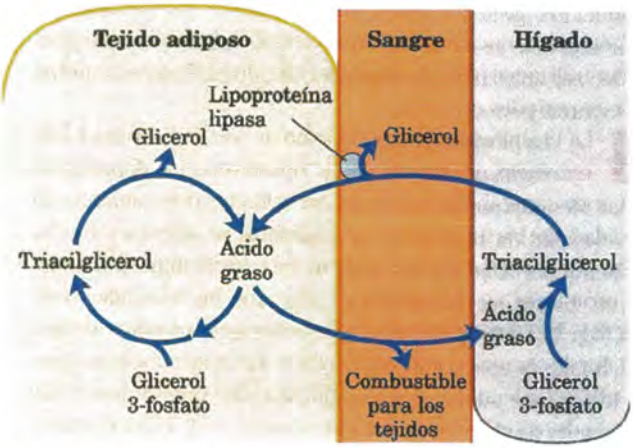


FIGURA 21–20 Ciclo del triacilglicerol En los mamíferos, las moléculas de triacilglicerol se degradan y resintetizan durante la inanición en un ciclo del triacilglicerol. Algunos de los ácidos grasos liberados por lipólisis del triacilglicerol en el tejido adiposo pasan a la sangre, mientras que el resto se utilizan para la resíntesis de triacilgliceroles. Parte de los ácidos grasos liberados a la sangre se utilizan para producir energía (en el músculo, por ejemplo), mientras que otros son captados por el hígado y utilizados en la síntesis de triacilgliceroles. Los triacilgliceroles sintetizados en el hígado se transportan por la sangre nuevamente hasta el tejido adiposo, en donde los ácidos grasos son liberados por acción de la lipoproteína lipasa extracelular, captados por los adipocitos y reesterificados en forma de triacilglicerol.

sangre (el transporte de lípidos en la sangre se discute en la Sección 21.4) y son captados de nuevo por el tejido adiposo después de su liberación del triacilglicerol por la lipoproteína lipasa extracelular (**Fig. 21–20**; véase también la Fig. 17–1). El flujo a través de este **ciclo del triacilglicerol** entre tejido adiposo e hígado puede ser muy bajo cuando hay otros combustibles disponibles y la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo es limitada, si bien, tal como se mencionó anteriormente, la proporción de ácidos grasos liberados que son reesterificados permanece aproximadamente constante alrededor del 75% en todas las condiciones metabólicas. El nivel de ácidos grasos en la sangre revela, por consiguiente, tanto la velocidad de liberación de ácidos grasos como el equilibrio entre la síntesis y la degradación de triacilgliceroles en el tejido adiposo y en el hígado.

Cuando se requiere la movilización de ácidos grasos para afrontar las necesidades energéticas, la liberación del tejido adiposo es estimulada por las hormonas glucagón y adrenalina (véanse las Figs. 17–3, 17–12). Simultáneamente, estas señales hormonales disminuyen la velocidad de glucólisis y aumentan la velocidad de gluconeogénesis en el hígado (proporcionando glucosa para el cerebro, tal como se discute más ampliamente en el Capítulo 23). Los ácidos grasos liberados son captados por diversos tejidos, entre ellos el músculo, donde se oxidan para proporcionar energía. Buena parte de los ácidos grasos captados por el hígado no son oxidados, sino que son reciclados a triacilglicerol, que vuelven al tejido adiposo.

La función del ciclo del glicerol, aparentemente inútil (los ciclos inútiles se discuten en el Capítulo 15), no está clara. No obstante, a medida que conocemos más detalles sobre cómo se mantiene y se regula de forma coordinada el ciclo del triacilglicerol mediante el metabolismo en dos órganos separados, aparecen algunas posibilidades. Por ejemplo, el exceso de capacidad en el ciclo del triacilglicerol (el ácido graso que finalmente se reconvierte en triacilglicerol en lugar de ser oxidado como combustible) podría representar una reserva energética en el torrente circulatorio durante el ayuno, reserva que sería movilizada más rápidamente en una emergencia de "huir o luchar" que la que estaría almacenada en forma de triacilglicerol.

El reciclado constante de triacilgliceroles en el tejido adiposo incluso durante la inanición plantea una segunda cuestión: ¿cuál es la fuente del glicerol 3-fosfato necesario para este proceso? Tal como se dijo antes la glucólisis está suprimida en estas condiciones por acción del glucagón y la adrenalina, por lo que hay poca DHAP disponible, al tiempo que el glicerol liberado durante la lipólisis no se puede convertir directamente en glicerol 3-fosfato en el tejido adiposo, ya que esta células carecen de glicerol quinasa (Fig. 21–17). Por tanto, ¿cómo se produce glicerol 3-fosfato en cantidad suficiente? La respuesta se encuentra en una ruta descubierta hace más de tres décadas y a la que se ha concedido poca atención hasta hace poco, una ruta unida íntimamente al ciclo del triacilglicerol y, en un sentido más amplio, al equilibrio entre metabolismo de los ácidos grasos y metabolismo glucídico.

El tejido adiposo genera glicerol 3-fosfato mediante gliceroneogénesis

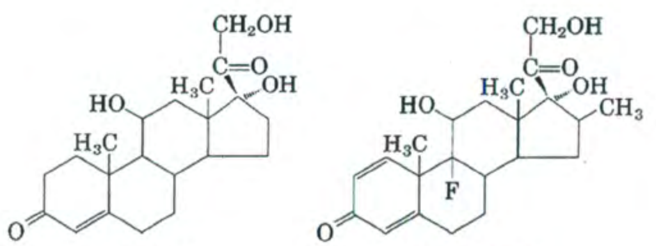
La **gliceroneogénesis** es una versión reducida de la gluconeogénesis, desde el piruvato a DHAP (véase la Fig. 14–16), seguida de la conversión de la DHAP en glicerol 3-fosfato por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica ligada a NAD (**Fig. 21–21**). A continuación se utiliza el glicerol 3-fosfato en la síntesis de triacilgliceroles. La gliceroneogénesis fue descubierto en la década de 1960 por Lea Reshef, Richard Hanson y John Ballard, y simultáneamente por Eleazar Shafrir y colaboradores, intrigados por la presencia de dos enzimas gluconeo-

FIGURA 21–21 Gliceroneogénesis. La ruta es esencialmente una versión abreviada de la gluconeogénesis, desde el piruvato a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), seguida de conversión de la DHAP en glicerol 3-fosfato, que se utiliza para la síntesis de triacilgliceroles.

génicos, la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa, en el tejido adiposo, tejido en el que no se sintetiza glucosa. Después de un largo período de ostracismo, se ha renovado el interés en esta vía gracias a la demostración de una conexión entre la gliceroneogénesis y la diabetes de aparición tardía (tipo 2), tal como veremos.

La gliceroneogénesis juega muchos papeles. En el tejido adiposo, la gliceroneogénesis acoplada a la reesterificación de ácidos grasos libres controla la velocidad de liberación de ácidos grasos a la sangre. En el tejido adiposo marrón, la misma ruta puede controlar la velocidad a la que se transfieren ácidos grasos libres a la mitocondria para su uso en la termogénesis (véase la Fig. 19–34). Finalmente, en los individuos humanos en ayunas la gliceroneogénesis sólo en el hígado sostiene la síntesis de suficiente glicerol 3-fosfato para poder justificar hasta el 65% de los ácidos grasos reesterificados a triacilglicerol.

El flujo a través del ciclo del triacilglicerol entre el hígado y el tejido adiposo está controlado en gran parte por la actividad de la PEP carboxiquinasa, que limita la velocidad tanto de la gluconeogénesis como la de la gliceroneogénesis. Hormonas glucocorticoides tales como el cortisol (un esteroide biológico derivado del colesterol; véase la Fig. 21–45) y la dexametasona (un glucocorticoide sintético) regulan recíprocamente los niveles de PEP carboxiquinasa en el hígado y en el tejido adiposo. Actuando a través del receptor de glucocorticoides, estas hormonas esteroideas aumentan la expresión del gen que codifica la PEP carboxiquinasa en el hígado, aumentando así la gluconeogénesis y la gliceroneogénesis **(Fig. 21–22)**.



Cortisol Dexametasona

La estimulación de la gliceroneogénesis conduce a un aumento en la síntesis de moléculas de triacilglicerol en el hígado y su liberación a la sangre. Al mismo tiempo, los glucocorticoides suprimen la expresión del gen que codifica la PEP carboxiquinasa en el tejido adiposo. Esto da lugar a una disminución de la gliceroneogénesis en el tejido adiposo; el resultado es que disminuye el reciclado de ácidos grasos, liberándose más ácidos grasos a la sangre. De este modo la gliceroneogénesis se regula recíprocamente en el hígado y el tejido adiposo, afectando al metabolismo lipídico de formas opuestas: una velocidad menor de gliceroneogénesis en el tejido adiposo conduce a una mayor liberación de ácidos grasos (en lugar de reciclarlos), mientras que una velocidad mayor en el hígado lleva a una síntesis y exportación incrementadas de triacilgliceroles. El resultado neto es un aumento del flujo a través del ciclo del triacilglicerol. Cuando los glucocorticoides ya no están presentes, el flujo a través del ciclo disminuye a medida que la expresión de la PEP carboxiquinasa aumenta en el tejido adiposo y disminuye en el hígado.

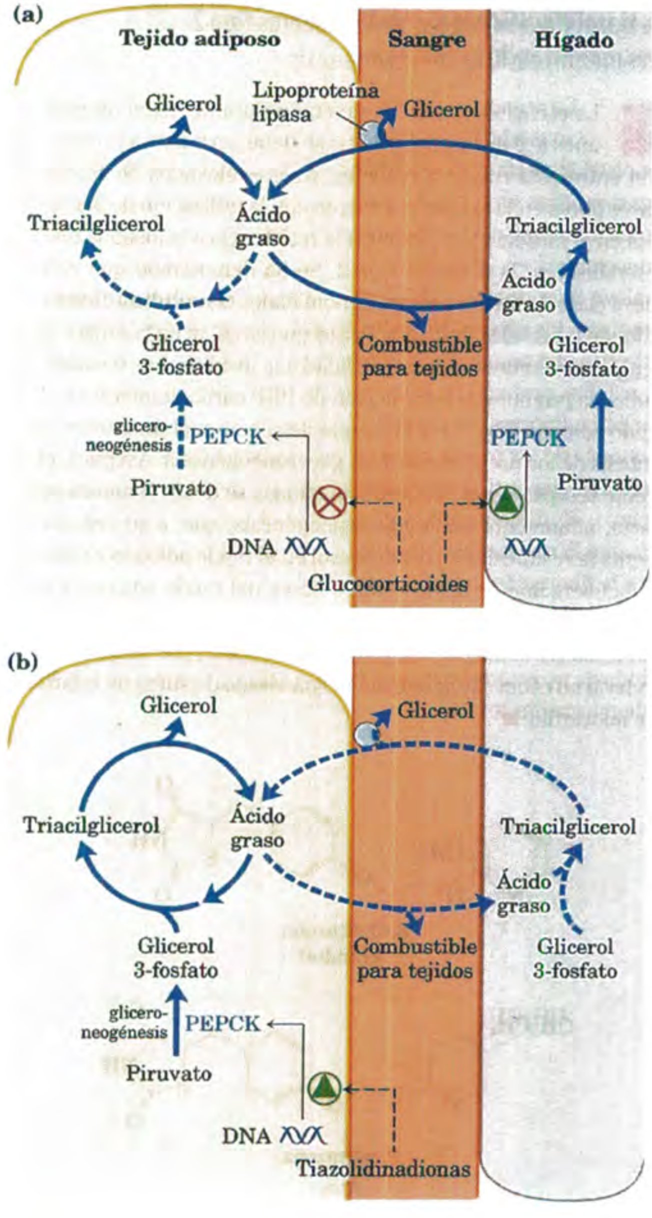
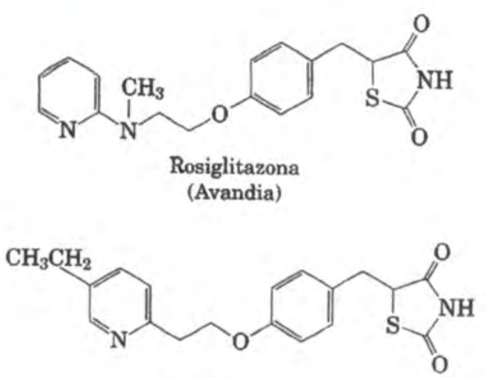


FIGURA 21–22 Regulación de la gliceroneogénesis. (a) Las hormonas glucocorticoideas estimulan la gliceroneogénesis y la gluconeogénesis en el hígado, mientras que suprimen la gliceroneogénesis en el tejido adiposo (por regulación recíproca de los genes que expresan la PEP carboxiquinasa (PEPCK) en los dos tejidos); esto aumenta el flujo a través del ciclo del triacilglicerol. El glicerol liberado por la degradación del triacilglicerol en el tejido adiposo pasa a la sangre y se transporta hasta el hígado, en donde se convierte mayoritariamente en glucosa, aunque una parte se convierte en glicerol 3-fosfato por la glicerol quinasa. **(b)** Actualmente se utiliza un tipo de fármacos denominados tiazolidinadionas para tratar la diabetes de tipo 2. En esta enfermedad, niveles elevados de ácidos grasos en la sangre interfieren con la utilización de la glucosa en el músculo y promueven la resistencia a la insulina. Las tiazolidinadionas activan un receptor nuclear denominado receptor γ de los peroxisomas activado por proliferadores (PPARγ), que induce la actividad de la PEP carboxiquinasa. Terapéuticamente, las tiazolidinadionas aumentan la velocidad de la gliceroneogénesis, con lo que aumentan la resíntesis de triacilgliceroles en el tejido adiposo y reducen la cantidad de ácidos grasos libres presentes en la sangre.

Las tiazolidinadionas tratan la diabetes tipo 2 incrementando la gliceroneogénesis

La atención que se ha prestado durante estos últimos años a la gliceroneogénesis se debe, en parte, a la conexión entre esta ruta y la diabetes. Niveles elevados de ácidos grasos libres en la sangre interfieren con la utilización de la glucosa en el músculo y promueven la resistencia a la insulina que desemboca en la diabetes tipo 2. Se ha demostrado que una nueva clase de medicamentos denominados **tiazolidinadionas** reducen los niveles de ácidos grasos que circulan en la sangre al tiempo que aumentan la sensibilidad a la insulina. Las tiazolidinadionas promueven la inducción de PEP carboxiquinasa en el tejido adiposo (Fig. 21–22), lo que lleva a un incremento en la síntesis de los precursores de la gliceroneogénesis. Así pues, el efecto terapéutico de la tiazolidinadionas se debe, al menos en parte, al aumento de la gliceroneogénesis, que, a su vez, aumenta la resíntesis de triacilglicerol en el tejido adiposo y reduce la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo a la sangre. Los beneficios de un medicamento de este tipo, la rosiglitazona (Avandia), se contrarrestan en parte, por razones que todavía no están claras, con un mayor riesgo de sufrir un infarto de miocardio. ■



Rosiglitazona
(Avandia)

Pioglitazona
(Atos)
Tiazolidinadionas

RESUMEN 21.2 Biosíntesis de triacilgliceroles

- Los triacilgliceroles se forman por la reacción de dos moléculas de acil graso–CoA con glicerol 3-fosfato para dar lugar a ácido fosfatídico; este producto se desfosforila dando diacilglicerol y a continuación se acetila con una tercera molécula de acil graso–CoA para formar un triacilglicerol.
- La síntesis y degradación de triacilglicerol están reguladas por hormonas.
- La movilización y el reciclado de las moléculas de triacilglicerol dan lugar a un ciclo del triacilglicerol. Los triacilgliceroles se resintetizan a partir de ácidos grasos libres y glicerol 3-fosfato incluso durante la inanición. La dihidroxiacetona fosfato, precursor del glicerol 3-fosfato, procede del piruvato vía gliceroneogénesis.

21.3 Biosíntesis de fosfolípidos de membrana

En el capítulo 10 introdujimos dos clases importantes de fosfolípidos de membrana: los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos. Se pueden formar muchas especies de fosfolípidos diferentes al combinar diversos ácidos grasos y grupos de cabeza polares con los armazones del glicerol o la esfingosina (véanse las Figs. 10–9 y 10–13). Todas las rutas biosintéticas posibles siguen unos pocos patrones básicos. Por lo general, la formación de fosfolípidos a partir de precursores sencillos requiere: (1) la síntesis del armazón de la molécula (glicerol o esfingosina); (2) la unión de los ácidos grasos al armazón en enlace éster o amida; (3) la adición de un grupo de cabeza hidrofílico unido al armazón mediante un enlace fosfodiéster; y, en algunos casos, (4) la alteración o el intercambio del grupo de cabeza para obtener el fosfolípido final.

En las células eucarióticas la síntesis de fosfolípidos tiene lugar principalmente en la superficie del retículo endoplasmático liso y en la membrana mitocondrial interna. Algunos fosfolípidos recién sintetizados permanecen en el sitio de síntesis, aunque la inmensa mayoría de ellas son destinados a otras localizaciones celulares.

El proceso mediante el cual los fosfolípidos insolubles en agua se desplazan desde el sitio de su síntesis hasta el punto donde finalmente realizarán su función no se conoce con exactitud, aunque concluiremos esta sección discutiendo algunos mecanismos que han aparecido a lo largo de los últimos años.

Las células tienen dos estrategias para unir los grupos de cabeza de los fosfolípidos

Los primeros pasos en la síntesis de los glicerofosfolípidos están compartidos con la ruta de los triacilgliceroles (Fig. 21–17): dos grupos acilo graso se esterifican con C-1 y C-2 del L-glicerol 3-fosfato para dar ácido fosfatídico. Frecuentemente, pero no de modo invariable, el ácido graso en la posición C-1 es saturado, mientras que el de C-2 es insaturado. Una segunda ruta hacia el ácido fosfatídico es la fosforilación de un diacilglicerol por una quinasa específica.

El grupo polar de cabeza de los glicerofosfolípidos está unido mediante un enlace fosfodiéster, en el que cada uno de los dos hidroxilos alcohólicos (uno en el grupo polar de cabeza y el otro en el C-3 del glicerol) forman un éster con el ácido fosfórico **(Fig. 21–23)**. En el proceso de biosíntesis uno de los hidroxilos es activado primero mediante la unión de un nucleótido, la citidina difosfato (CDP). Seguidamente, la citidina monofosfato (CMP) se desplaza mediante un ataque nucleofílico por parte del otro hidroxilo **(Fig. 21–24)**. El CDP se puede unir bien al diacilglicerol, formando en este caso el ácido fosfatídico activado **CDP-diacilglicerol** (estrategia 1), o bien al hidroxilo del grupo de cabeza (estrategia 2). Las células eucarióticas emplean ambas estrategias, mientras que las procarióticas utilizan solamente la primera.

La importancia central que tienen los nucleótidos de citidina en la biosíntesis de lípidos fue descubierta por el bioquímico estadounidense Eugene P. Kennedy a principios de la década de 1960.

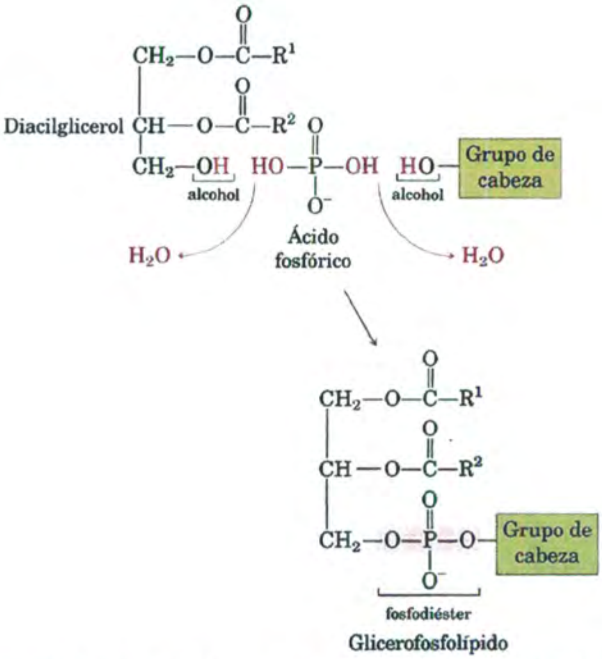


FIGURA 21–23 Unión del grupo de cabeza. El grupo de cabeza del fosfolípido se une al diacilglicerol mediante un enlace fosfodiéster, formado cuando el ácido fosfórico se condensa con dos alcoholes, eliminando dos moléculas de H_2O.

La síntesis de fosfolípidos en *E. coli* utiliza CDP-diacilglicerol

La primera estrategia para la unión de grupos de cabeza se ilustra mediante la síntesis de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol en *Escherichia coli*. El diacilglicerol se activa por condensación del ácido fosfatídico con citidina trifosfato (CTP) formando CDP-diacilglicerol con eliminación de pirofosfato **(Fig. 21–25)**. El desplazamiento de CMP mediante el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina o del hidroxilo C-1 del glicerol 3-fosfato da lugar a la **fosfatidilserina** o al fosfatidilglicerol 3-fosfato, respectivamente. Este último es todavía modificado mediante rotura del monoéster fosfato (con liberación de P_i), dando lugar al **fosfatidilglicerol.**

Tanto la fosfatidilserina como el fosfatidilglicerol pueden actuar como precursores de otros lípidos de membrana en bacterias (Fig. 21–25). La descarboxilación de la porción serina de la fosfatidilserina por la fosfatidilserina descarboxilasa produce **fosfatidiletanolamina.**

En *E. coli* la condensación de dos moléculas de fosfatidilglicerol, con la eliminación de una de glicerol, forma **cardiolipina,** en la que se unen dos diacilgliceroles a través de un grupo de cabeza común.

Eugene P. Kennedy

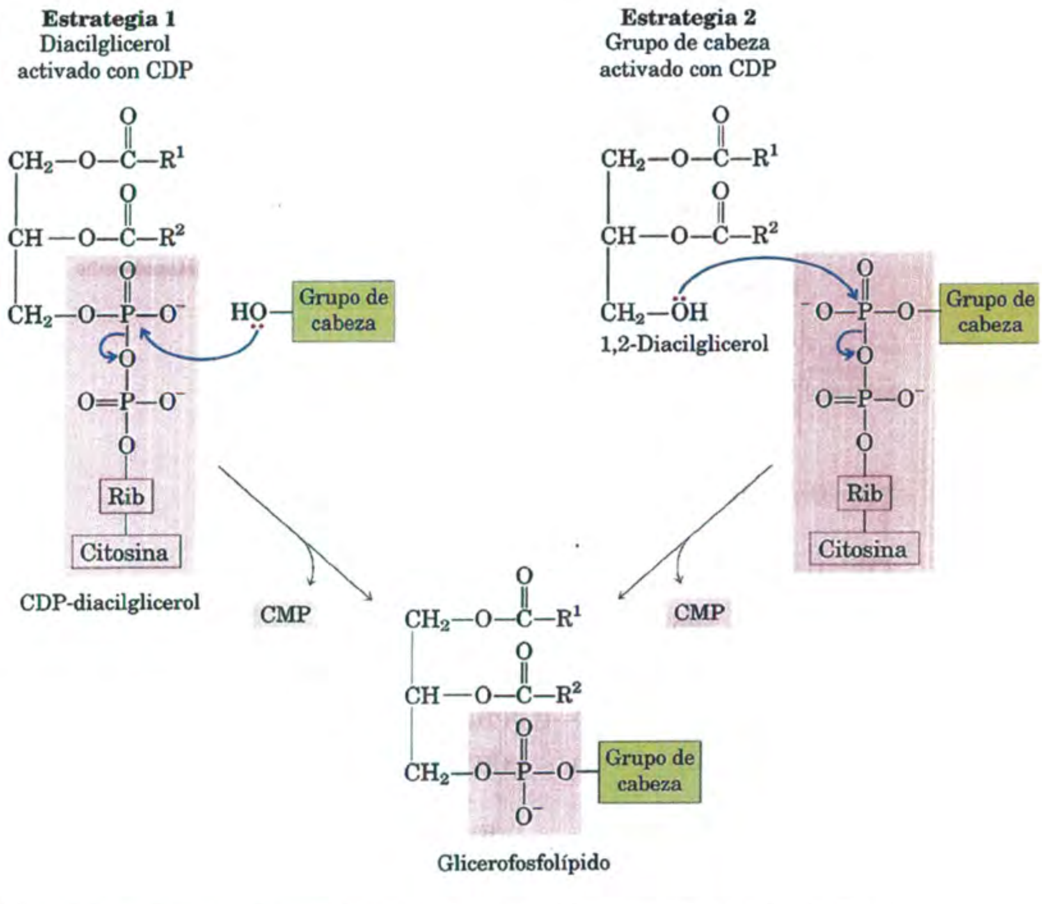


FIGURA 21–24 Dos estrategias generales para formar el enlace fosfodiéster de los fosfolípidos. En los dos casos el CDP suministra el grupo fosfato del enlace fosfodiéster.

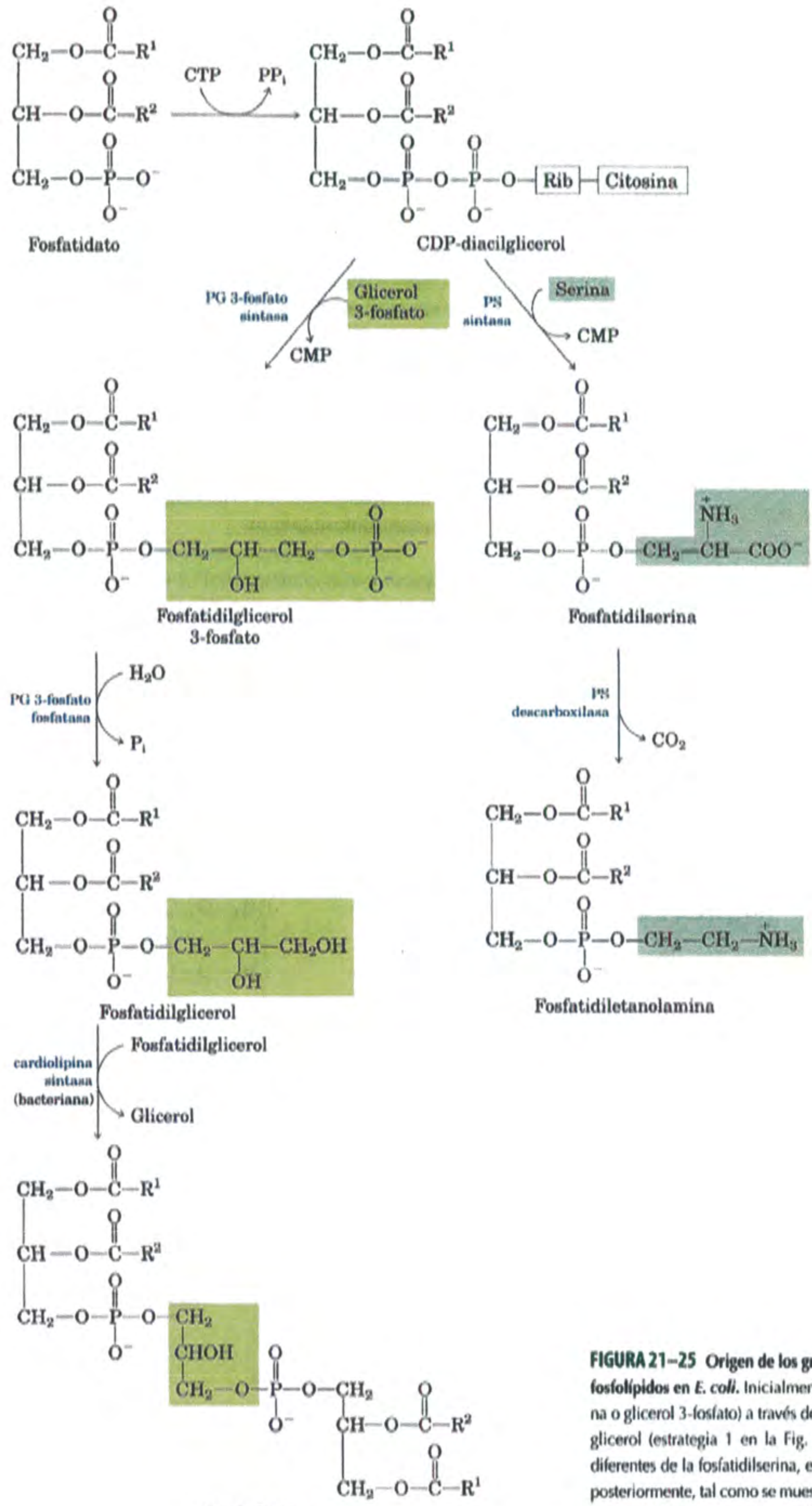


FIGURA 21–25 Origen de los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos en *E. coli*. Inicialmente se une un grupo polar (serina o glicerol 3-fosfato) a través de un intermediario CDP-diacilglicerol (estrategia 1 en la Fig. 21–24). En otros fosfolípidos diferentes de la fosfatidilserina, el grupo de cabeza se modifica posteriormente, tal como se muestra aquí. En los nombres de los enzimas, PG representa fosfatidilglicerol y PS, fosfatidilserina.

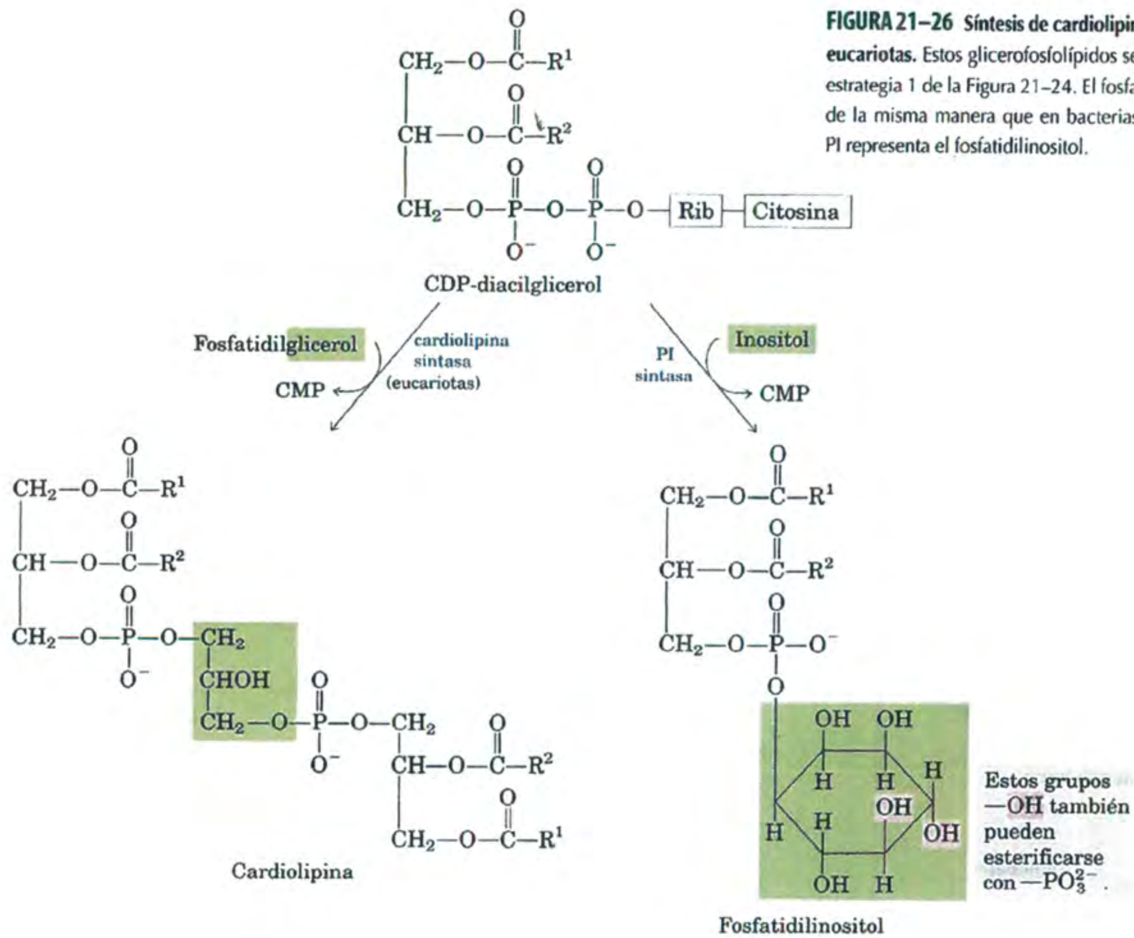


FIGURA 21–26 Síntesis de cardiolipina y fosfatidilinositol en eucariotas. Estos glicerofosfolípidos se sintetizan mediante la estrategia 1 de la Figura 21–24. El fosfatidilglicerol se sintetiza de la misma manera que en bacterias (véase la Fig. 21–25). PI representa el fosfatidilinositol.

Las eucariotas sintetizan fosfolípidos aniónicos desde CDP-diacilglicerol

En los organismos eucariotas el fosfatidilglicerol, la cardiolipina y los fosfatidilinositoles (todos ellos fosfolípidos aniónicos; véase la Fig. 10–9) se sintetizan con la misma estrategia utilizada para la síntesis de fosfolípidos en bacterias. El fosfatidilglicerol se forma igual que en las bacterias. La síntesis de cardiolipina en eucariotas difiere ligeramente: el fosfatidilglicerol se condensa con CDP-diacilglicerol **(Fig. 21–26)**, en lugar de con otra molécula de fosfatidilglicerol como sucede en *Escherichia coli* (Fig. 21–25).

El fosfatidilinositol se sintetiza por condensación del CDP-diacilglicerol con el inositol (Fig. 21–26). **Fosfatidilinositol quinasas** específicas convierten a continuación el fosfatidilinositol en sus derivados fosforilados (ver Fig. 10–17). El fosfatidilinositol y sus productos fosforilados de la membrana plasmática juegan un papel central en la transducción de señal en eucariotas (véanse las Figs. 12–10 y 12–16).

Las rutas eucarióticas hasta la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina están interrelacionadas

En la levadura, al igual que sucede en las bacterias, la fosfatidilserina puede producirse por condensación del CDP-diacilglicerol con serina, y la fosfatidiletanolamina puede ser sintetizada en la reacción catalizada por el enzima fosfatidilserina descarboxilasa **(Fig. 21–27)**.

La fosfatidiletanolamina, a su vez, se puede convertir en **fosfatidilcolina** (lecitina) mediante la adición de tres grupos metilo a su grupo amino. La *S*-adenosilmetionina es el dador de grupo metilo (véase la Fig. 18-18) en las tres reacciones de metilación. Estas rutas constituyen las fuentes principales de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en todas las células eucarióticas.

En los mamíferos la fosfatidilserina no se sintetiza a partir del CDP-diacilglicerol sino que proviene de la fosfatidiletanolamina o de la fosfatidilcolina mediante una, de entre dos posibles, reacciones de intercambio del grupo de cabeza que tienen lugar en el retículo endoplasmático **(Fig. 21–28a)**. La síntesis de la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina en los mamíferos tiene lugar según la estrategia 2 descrita en la Figura 21-24: fosforilación y activación del grupo de cabeza seguido por condensación con diacilglicerol. Por ejemplo, la colina se reutiliza ("recupera") al ser fosforilada para luego convertirse en CDP-colina por condensación con CTP. Un diacilglicerol desplaza CMP de la CDP-colina produciendo fosfatidilcolina (Fig. 21–28b). Una ruta de recuperación análoga convierte la etanolamina obtenida de la dieta en fosfatidiletanolamina.

En el hígado la fosfatidilcolina se produce también mediante metilación de la fosfatidiletanolamina (utilizando

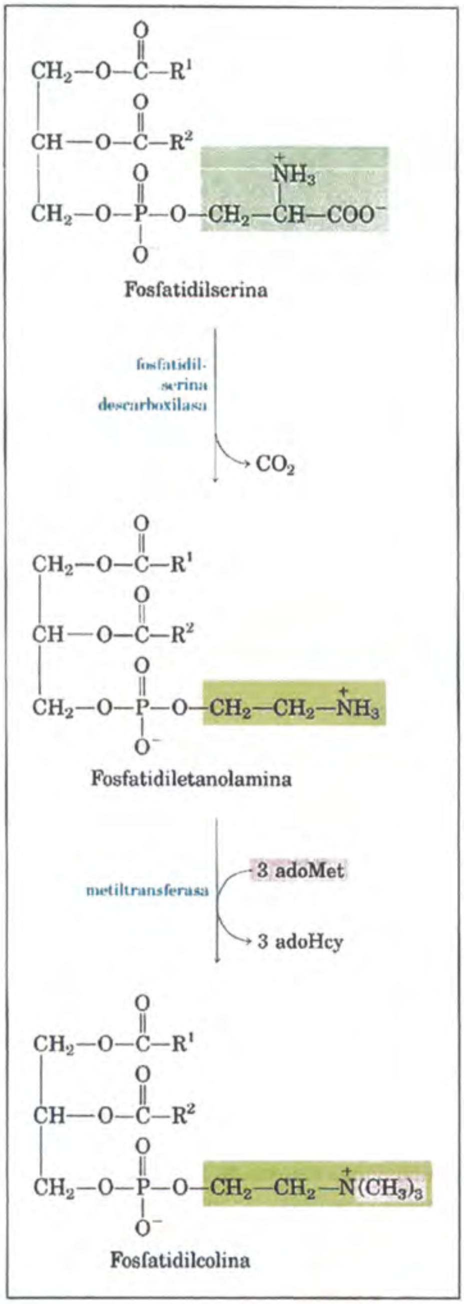


FIGURA 21–27 Ruta principal desde la fosfatidilserina a la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en todos los eucariotas. adoMet es *S*-adenosilmetionina; adoHcy representa *S*-adenosilhomocisteína.

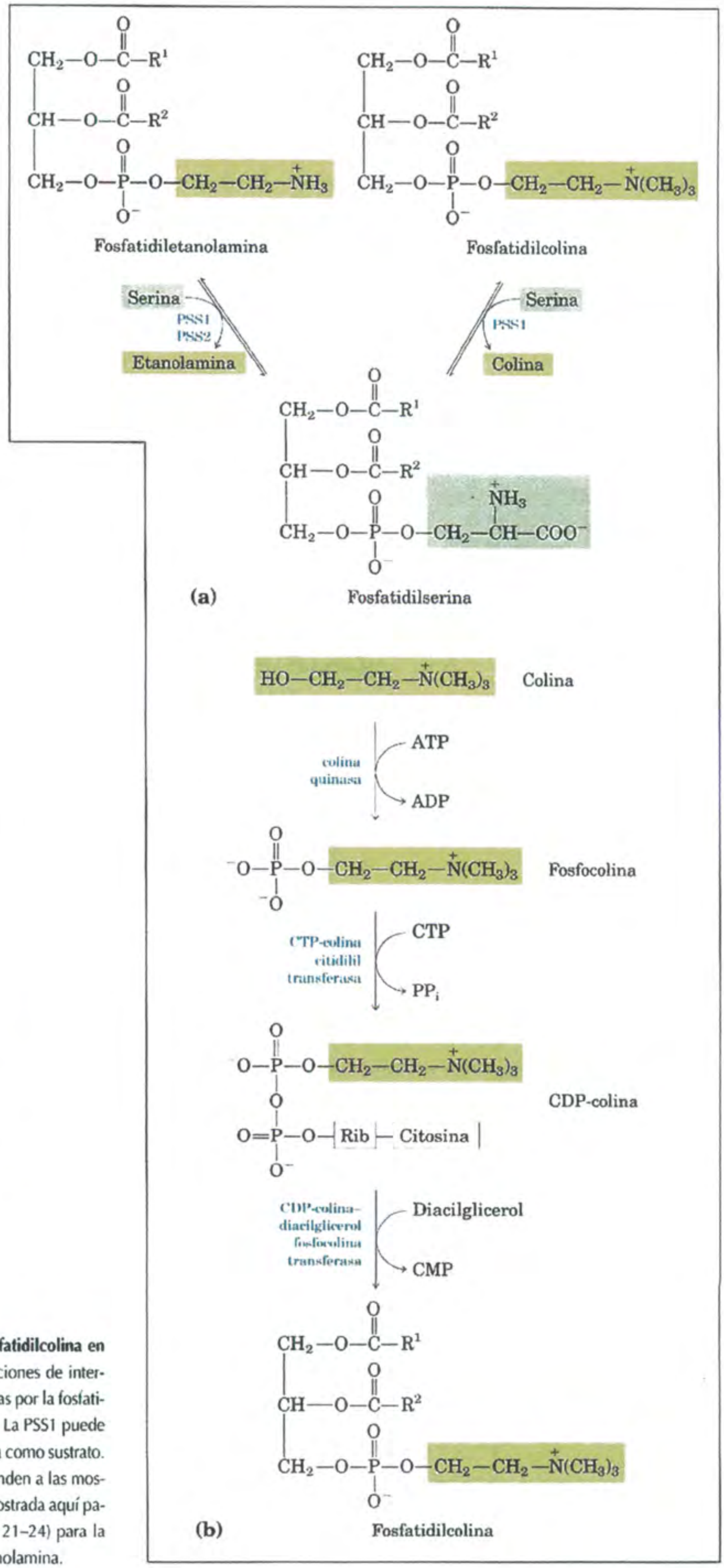


FIGURA 21–28 Ruta de la síntesis de fosfatidilserina y fosfatidilcolina en mamíferos. (a) La fosfatidilserina se sintetiza mediante reacciones de intercambio del grupo de cabeza dependientes de Ca^{2+} catalizadas por la fosfatidilserina sintasa 1 (PSS1) o la fosfatidilserina sintasa 2 (PSS2). La PSS1 puede utilizar indistintamente fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina como sustrato. Las rutas utilizadas por las bacterias y las levaduras corresponden a las mostradas en la Figura 21–27. **(b)** Se utiliza la misma estrategia mostrada aquí para la síntesis de la fosfatidilcolina (estrategia 2 de la Figura 21–24) para la recuperación de la etanolamina en la síntesis de fosfatidiletanolamina.

S-adenosilmetionina, como se ha descrito ya con anterioridad), pero en el resto de tejidos la fosfatidilcolina se produce solamente por condensación del diacilglicerol con CDP-colina. Las rutas para la formación de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en diversos organismos se resumen en la **Figura 21-29**.

Aunque el papel de la composición de lípidos sobre la función de las membranas no se conoce en su totalidad, pueden observarse importantes efectos por cambios en esta composición. Se han aislado moscas del vinagre con mutaciones en el gen que codifica la etanolamina quinasa (análoga a la colina quinasa; Fig. 21–28b).

La falta de este enzima elimina una ruta para la síntesis de fosfatidiletanolamina, reduciendo por tanto el contenido de este lípido en las membranas celulares. Las moscas con esta mutación (las que presentan el genotipo "*easily shocked*") muestran una parálisis pasajera después de una estimulación eléctrica o un shock mecánico que, en cambio, no afecta a las moscas de tipo salvaje.

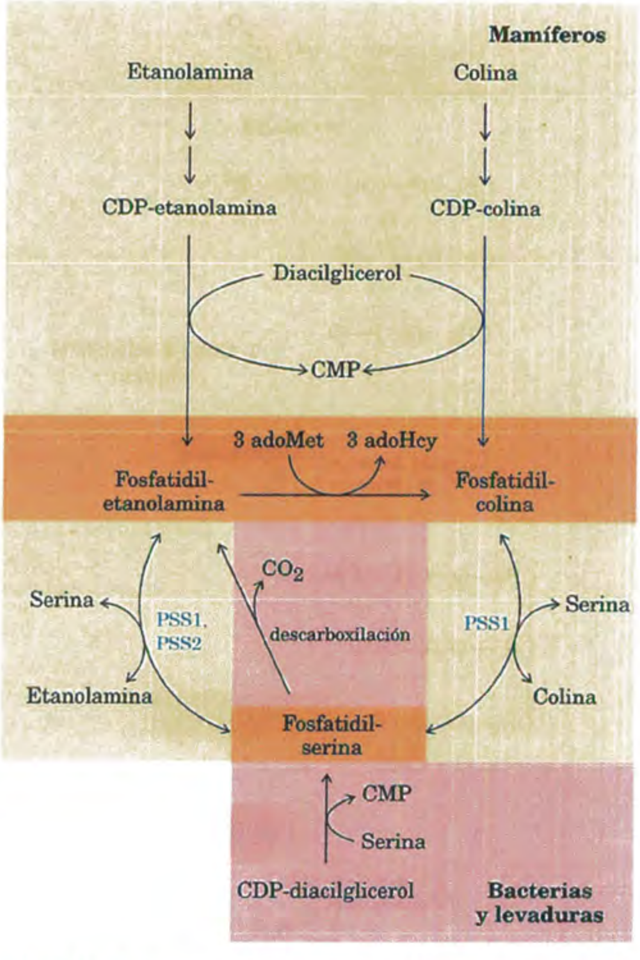


FIGURA 21–29 Resumen de las rutas de síntesis de los principales fosfolípidos. Las rutas varían según los organismos. En este diagrama, las rutas utilizadas por los mamíferos se resaltan en amarillo; las utilizadas por las bacterias y levaduras en rosa. El sombreado naranja muestra las rutas solapantes. En los mamíferos la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina se sintetizan mediante una ruta que utiliza diacilglicerol y el CDP-derivado del grupo de cabeza adecuado. La conversión de fosfatidiletanolamina en fosfatidilcolina en los mamíferos sólo tiene lugar en el hígado. En las Figuras 21–27 y 21–28 se detallan las rutas de síntesis de fosfatidilserina en diversas clases de organismos.

La síntesis de plasmalógenos requiere la formación de un alcohol graso unido por enlace éter

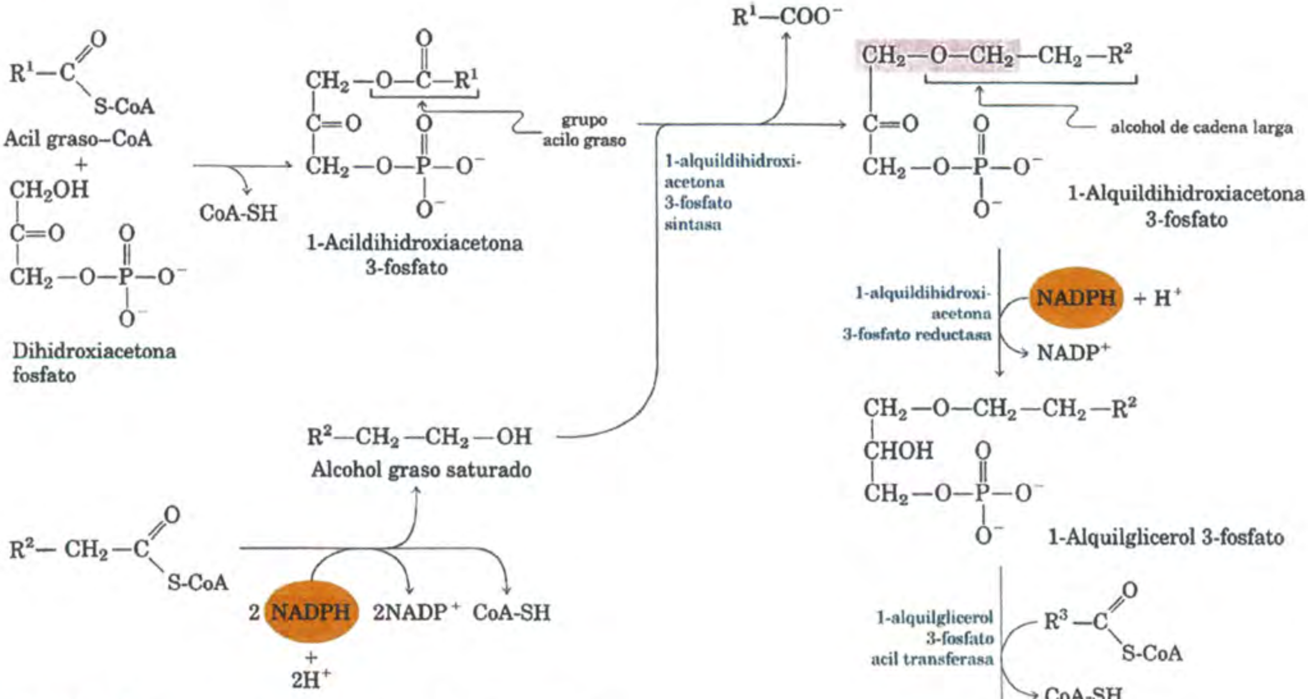
En la ruta biosintética que conduce a lípidos con función éter, entre ellos los **plasmalógenos** y el **factor activador plaquetario** (véase la Fig. 10–10), interviene el desplazamiento de un grupo acilo graso esterificado por la acción de un alcohol de cadena larga para formar el enlace éter (**Fig. 21–30**). A continuación tiene lugar la unión del grupo de cabeza mediante mecanismos esencialmente iguales a los utilizados en la formación de los fosfolípidos comunes unidos por enlace éster. Finalmente, el doble enlace característico de los plasmalógenos (que aparece sombreado en azul en la Fig. 21–30) es introducido gracias a la acción de una oxidasa de función mixta similar a la responsable de la desaturación de los ácidos grasos (Fig. 21–13). El peroxisoma es el sitio principal en el que tiene lugar la síntesis de plasmalógenos.

La síntesis de los esfingolípidos y de los glicerofosfolípidos requiere precursores y algunos mecanismos

La biosíntesis de esfingolípidos tiene lugar en cuatro fases: (1) síntesis de la amina de 18 carbonos **esfinganina** a partir del palmitil-CoA y serina; (2) unión de un ácido graso en enlace amida para formar ***N*-acilesfinganina;** (3) desaturación de la porción de esfinganina para formar ***N*-acilesfingosina** (ceramida), y (4) unión de un grupo de cabeza para producir un esfingolípido tal como un **cerebrósido** o **esfingomielina** (**Fig. 21–31**).

Los primeros pasos de la síntesis de esfingolípidos tienen lugar en el retículo endoplasmático, mientras que la unión de los grupos de cabeza del último paso tiene lugar en el complejo de Golgi. La ruta comparte determinadas características propias de las rutas que conducen a los glicerofosfolípidos: así por ejemplo, el NADPH proporciona el poder reductor mientras los ácidos grasos entran en forma de sus derivados de CoA activados. En la formación de cerebrósidos, los azúcares entran en su forma activada de derivados de nucleótidos. La unión del grupo de cabeza en la síntesis de esfingolípidos presenta varios aspectos nuevos. Así por ejemplo, la fosfatidilcolina, en lugar de la CDP-colina, es el dador de fosfocolina en la síntesis de esfingomielina.

En el caso de los glucolípidos, los cerebrósidos y los **gangliósidos** (véase la Fig. 10–13), el grupo de cabeza es un azúcar que está unido directamente al hidroxilo C-1 de la esfingosina mediante un enlace glucosídico, en lugar de un enlace fosfodiéster; en este caso, el dador del azúcar es un UDP-azúcar (UDP-glucosa o UDP-galactosa).



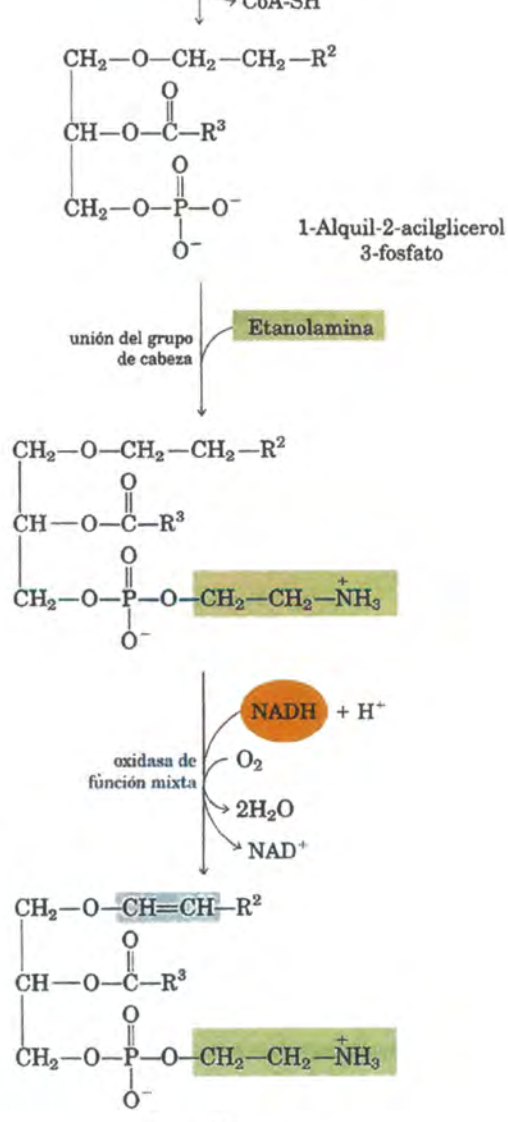


FIGURA 21–30 Síntesis de lípidos con enlace éter y plasmalógenos. El enlace éter recién formado está sombreado en rosa. El intermediario 1-alquil-2-acilglicerol 3-fosfato es el análogo éter del ácido fosfatídico. Los mecanismos para unir los grupos de cabeza a los lípidos con enlace éter son esencialmente los mismos que para sus análogos con enlace éster. El doble enlace característico de los plasmalógenos (aquí sombreado en azul) es introducido en un paso final mediante una oxidasa de función mixta similar a la que se muestra en la Figura 21–13.

Los lípidos polares están destinados a membranas celulares específicas

Después de su síntesis en el RE liso los lípidos polares, entre ellos los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y los glucolípidos, se insertan en membranas celulares específicas en proporciones específicas mediante mecanismos todavía no bien conocidos. Los lípidos de membrana son insolubles en agua, por lo que no pueden difundir simplemente desde su sitio de síntesis (el RE) hasta su lugar de inserción. En lugar de ello, se transportan desde el RE hasta el complejo de Golgi, en donde también puede tener lugar síntesis adicional. A continuación son transferidos en vesículas membranosas que se desprenden por gemación del complejo de Golgi para seguidamente trasladarse y fundirse con las membranas diana (véase la Fig. 11–22). Estas rutas no se conocen en profundidad, si bien se están produciendo ciertos avances en su estudio. Una proteína de 68 kDa denominada CERT (de *cer*amide *t*ransport) transporta la ceramida desde el RE hasta el complejo de Golgi. También existen proteínas citosólicas que unen fosfolípidos y esteroles transportándolos de una membrana celular a otra. Estos mecanismos contribuyen a establecer la composición lipídica característica de la membrana de cada orgánulo (véase la Fig. 11–2).

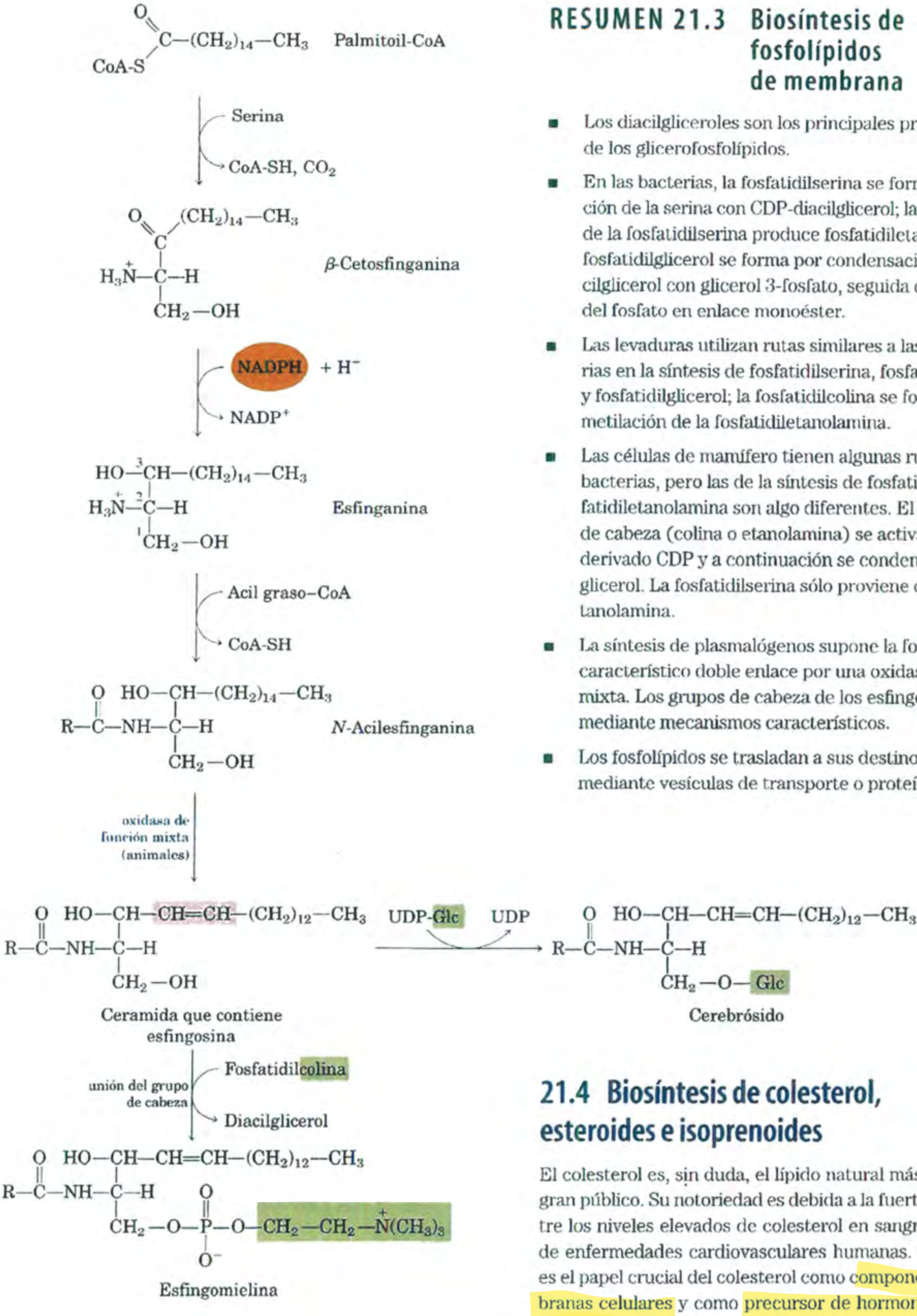


FIGURA 21–31 Biosíntesis de esfingolípidos. La condensación del palmitil-CoA y serina (formando β-cetoesfinganina) seguida por la reducción con NADPH da lugar a la esfinganina, que se acila dando *N*-acilesfinganina (una ceramida). En los animales se crea un doble enlace (sombreado en rosa) por una oxidasa de función mixta antes de la adición final de un grupo de cabeza: fosfatidilcolina para formar esfingomielina o glucosa para formar un cerebrósido.

RESUMEN 21.3 Biosíntesis de fosfolípidos de membrana

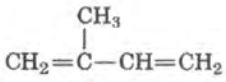
- Los diacilgliceroles son los principales precursores de de los glicerofosfolípidos.
- En las bacterias, la fosfatidilserina se forma por condensación de la serina con CDP-diacilglicerol; la descarboxilación de la fosfatidilserina produce fosfatidiletanolamina. El fosfatidilglicerol se forma por condensación del CDP-diacilglicerol con glicerol 3-fosfato, seguida de la eliminación del fosfato en enlace monoéster.
- Las levaduras utilizan rutas similares a las de las bacterias en la síntesis de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol; la fosfatidilcolina se forma por metilación de la fosfatidiletanolamina.
- Las células de mamífero tienen algunas rutas a las de las bacterias, pero las de la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son algo diferentes. El grupo alcohol de cabeza (colina o etanolamina) se activa en forma de derivado CDP y a continuación se condensa con diacilglicerol. La fosfatidilserina sólo proviene de la fosfatidiletanolamina.
- La síntesis de plasmalógenos supone la formación de su característico doble enlace por una oxidasa de función mixta. Los grupos de cabeza de los esfingolípidos se unen mediante mecanismos característicos.
- Los fosfolípidos se trasladan a sus destinos intracelulares mediante vesículas de transporte o proteínas específicas.

21.4 Biosíntesis de colesterol, esteroides e isoprenoides

El colesterol es, sin duda, el lípido natural más conocido por el gran público. Su notoriedad es debida a la fuerte correlación entre los niveles elevados de colesterol en sangre y la incidencia de enfermedades cardiovasculares humanas. Menos conocido es el papel crucial del colesterol como componente de las membranas celulares y como precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares. El colesterol es una molécula esencial en muchos animales, incluido el ser humano, pero no es necesario en la dieta de los mamíferos porque todas las células pueden sintetizarlo a partir de precursores sencillos.

Aunque la estructura de este compuesto de 27 carbonos sugiere una ruta biosintética compleja, todos sus átomos de carbono provienen de un único precursor: el acetato. Las unidades de **isopreno,** que son los intermediarios esenciales en la ruta

desde el acetato hasta el colesterol, son precursores de otros muchos lípidos naturales, y los mecanismos mediante los que se polimerizan las unidades de isopreno son similares en todas estas rutas.



Isopreno

Comenzaremos con una descripción de las principales etapas en la biosíntesis del colesterol a partir del acetato y a continuación discutiremos el transporte del colesterol en la sangre, su captación por las células y la regulación de la síntesis del colesterol en individuos normales y en los que presentan defectos en la captación o transporte del mismo. A continuación consideraremos otros componentes celulares derivados del colesterol tales como los ácidos biliares y las hormonas esteroideas. Finalmente, se presentará un bosquejo de las rutas biosintéticas que conducen a alguno de los muchos compuestos derivados de las unidades de isopreno, que comparten etapas iniciales de la vía del colesterol, con el fin de ilustrar la extraordinaria versatilidad de las condensaciones isoprenoides en biosíntesis.

El colesterol se forma a partir del acetil-CoA en cuatro fases

El colesterol, al igual que los ácidos grasos de cadena larga, se forma a partir de acetil-CoA, pero el plan de formación es totalmente diferente. En experimentos iniciales se alimentaron animales con acetato marcado con ^{14}C en el carbono metílico o en el carboxílico. El patrón de marcaje en el colesterol aislado de los dos grupos de animales **(Fig. 21–32)** proporcionó la clave para clarificar los pasos enzimáticos necesarios en la biosíntesis del colesterol.

La síntesis tiene lugar en cuatro fases tal como se muestra en la **Figura 21–33**: (1) tres unidades de acetato se condensan para formar un intermediario de seis átomos de carbono, el mevalonato; (2) conversión del mevalonato en unidades de isopreno activado; (3) polimerización de seis unidades de isopreno de 5 carbonos para dar lugar a la estructura lineal de 30 carbonos del escualeno, y (4) ciclación del escualeno para formar los cuatro anillos del núcleo esteroide además de una serie de cambios adicionales (oxidaciones, eliminación o migración de grupos metilo) para producir el colesterol.

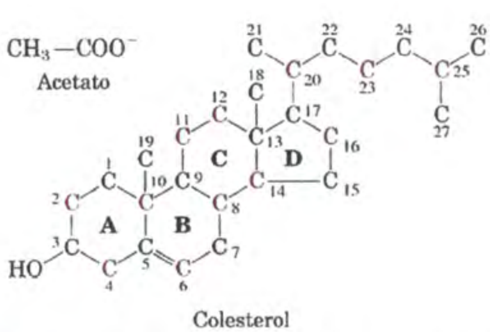


FIGURA 21–32 Origen de los átomos de carbono del colesterol. El origen puede deducirse de experimentos con trazadores utilizando acetato marcado en el carbono metílico (negro) o en el carbono carboxílico (rojo). Los diferentes anillos del sistema anular del colesterol se designan de A a D.

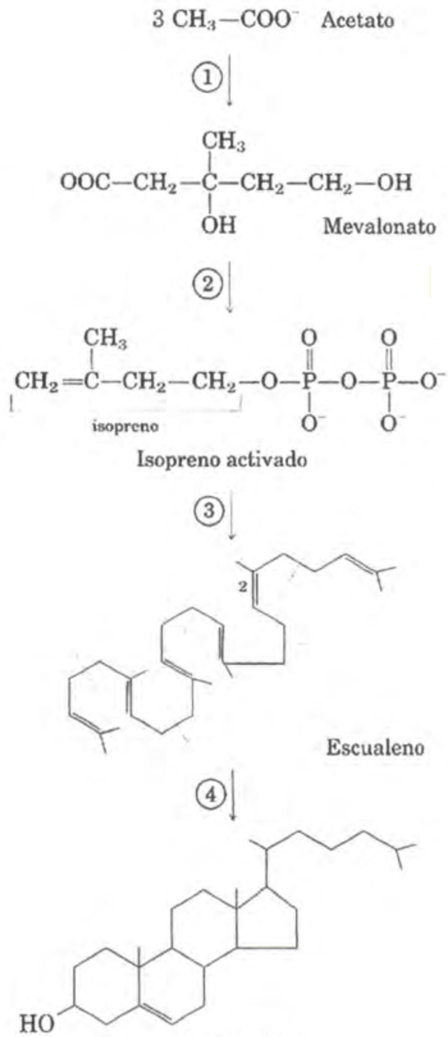


FIGURA 21–33 Resumen de la biosíntesis del colesterol. Las cuatro etapas se discuten en el texto. Las unidades de isopreno en el escualeno están separadas por líneas discontinuas rojas.

Fase (1) Síntesis del mevalonato a partir del acetato La primera fase en la biosíntesis del colesterol lleva al intermedio **mevalonato (Fig. 21–34)**. Dos moléculas de acetil-CoA se condensan formando acetoacetil-CoA que a su vez se condensa con una tercera molécula de acetil-CoA para dar lugar al compuesto de seis carbonos **β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA).**

Estas dos primeras reacciones están catalizadas por la **tiolasa** y la **HMG-CoA sintasa,** respectivamente. La HMG-CoA sintasa citosólica de esta ruta es diferente al isozima mitocondrial que cataliza la síntesis de HMG-CoA en la formación de cuerpos cetónicos (véase la Fig. 17–18).

La tercera reacción es el paso de compromiso, limitante de velocidad: la reducción del HMG-CoA a mevalonato, para la cual dos moléculas de NADPH ceden dos electrones cada una. La **HMG-CoA reductasa,** una proteína integral de membrana del RE liso es, tal como veremos, el punto principal de regulación en la ruta del colesterol.

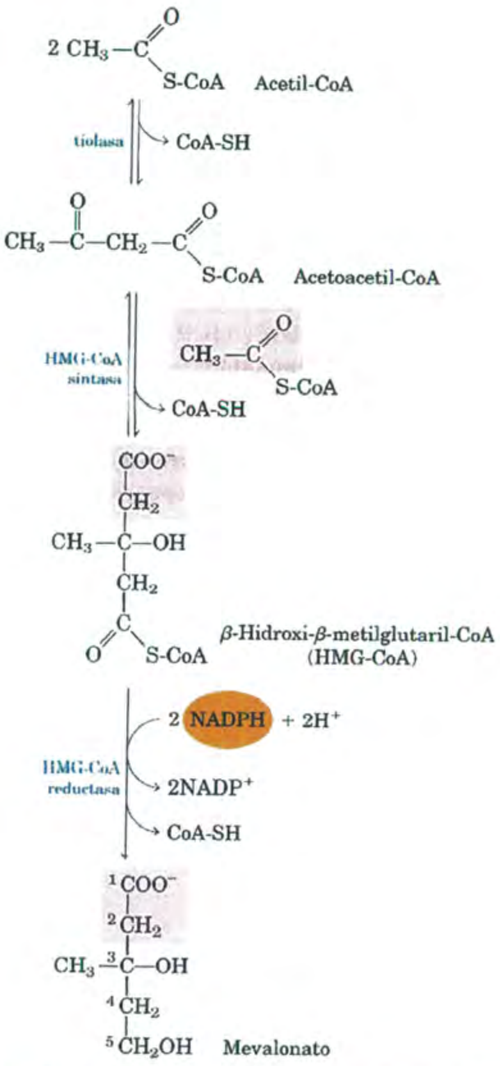


FIGURA 21–34 Formación del mevalonato a partir de acetil-CoA. El origen de C-1 y C-2 del mevalonato a partir del acetil-CoA se muestra en rosa.

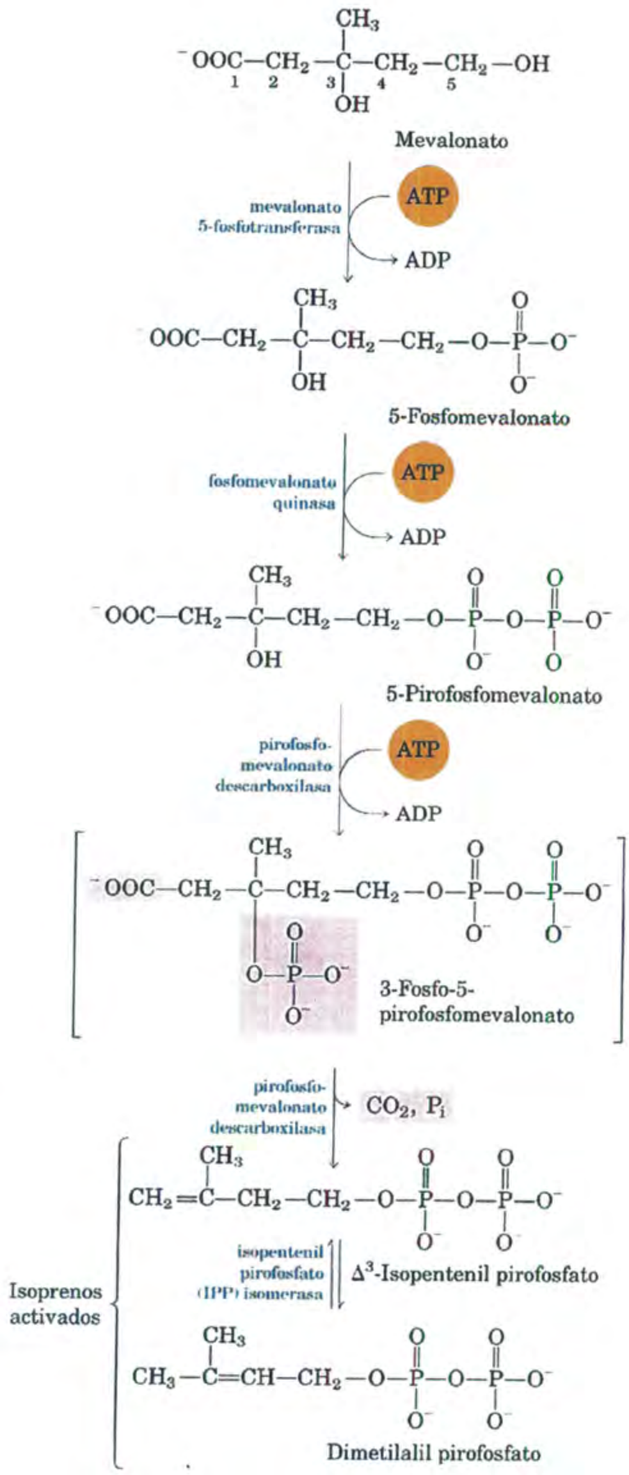


FIGURA 21–35 Conversión del mevalonato en unidades de isopreno activo. Seis de estas unidades activadas se combinan para formar el escualeno (véase la Fig. 21–36). Los grupos salientes del 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato están sombreados en rosa. El intermedio entre corchetes es hipotético.

Fase ② Conversión del mevalonato en dos isoprenos activados En la siguiente fase de la síntesis de colesterol, se transfieren tres grupos fosfato de tres moléculas de ATP al mevalonato **(Fig. 21–35)**. El fosfato unido al grupo hidroxilo C-3 del mevalonato en el intermedio 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato es un buen grupo saliente; en el paso siguiente salen este fosfato y el grupo carboxilo vecinos, produciendo un doble enlace en el producto de cinco carbonos **Δ^3-isopentenil pirofosfato.** Éste es el primero de los dos isoprenos activados cruciales en la formación del colesterol. La isomerización del Δ^3-isopentenil pirofosfato da lugar al segundo isopreno activado, el **dimetilalil pirofosfato.** La síntesis de isopentenil pirofosfato en el citoplasma de las células vegetales sigue la misma ruta aquí descrita. Sin embargo, los cloroplastos de las plantas y muchas bacterias utilizan una ruta independiente del mevalonato. Esta ruta alternativa no existe en animales, por lo que es un objetivo interesante para el desarrollo de nuevos antibióticos.

Fase ③ Condensación de seis unidades de isopreno activado para formar escualeno El isopentenil pirofosfato y el dimetilalil pirofosfato experimentan una condensación "cabeza-cola" en la que se desplaza un grupo pirofosfato y se forma una

cadena de 10 carbonos, el **geranil pirofosfato (Fig. 21-36)**. (La "cabeza" es el extremo al que está unido el pirofosfato.) El geranil pirofosfato experimenta otra condensación "cabeza-cola" con isopentenil pirofosfato, dando el intermediario de 15 carbonos **farnesil pirofosfato.** Finalmente, dos moléculas de farnesil pirofosfato se unen cabeza con cabeza, eliminándose los dos grupos pirofosfato y formándose **escualeno.**

Los nombres comunes de estos intermediarios proceden de las fuentes de las que fueron aislados originalmente. El geraniol, componente del aceite de rosas, tiene el aroma de los geranios, y el farnesol proviene de las flores de un tipo de acacia. Muchos aromas naturales de origen vegetal se sintetizan a partir de unidades de isopreno. El escualeno, aislado por primera vez del hígado de tiburón (género *Squalus*), tiene 30 carbonos, 24 en la cadena principal y 6 en forma de ramificaciones de grupos metilo.

Fase ④ Conversión del escualeno en el núcleo esteroideo de cuatro anillos Cuando se representa la molécula de escualeno en la forma de la **Figura 21-37** es evidente la relación entre su estructura lineal y la cíclica de los esteroles. Todos los esteroles tienen los cuatro anillos fusionados que forman el núcleo esteroide y todos son alcoholes con un grupo hidroxilo en C-3; de ahí el nombre "esterol". Por acción de la **escualeno monooxigenasa** se añade un átomo de oxígeno del O_2 al extremo de la cadena del escualeno, formándose un epóxido. Este enzima es otra oxidasa de función mixta (Recuadro 21-1); el NADPH reduce el otro átomo del O_2 a H_2O. Los dobles enlaces del producto, **escualeno 2,3-epóxido,** están colocados de modo que una reacción concertada convierte el escualeno epóxido lineal en una estructura cíclica. En las células animales esta ciclación conduce a la formación de **lanosterol,** que contiene los cuatro anillos característicos del núcleo esteroideo. El lanoste-

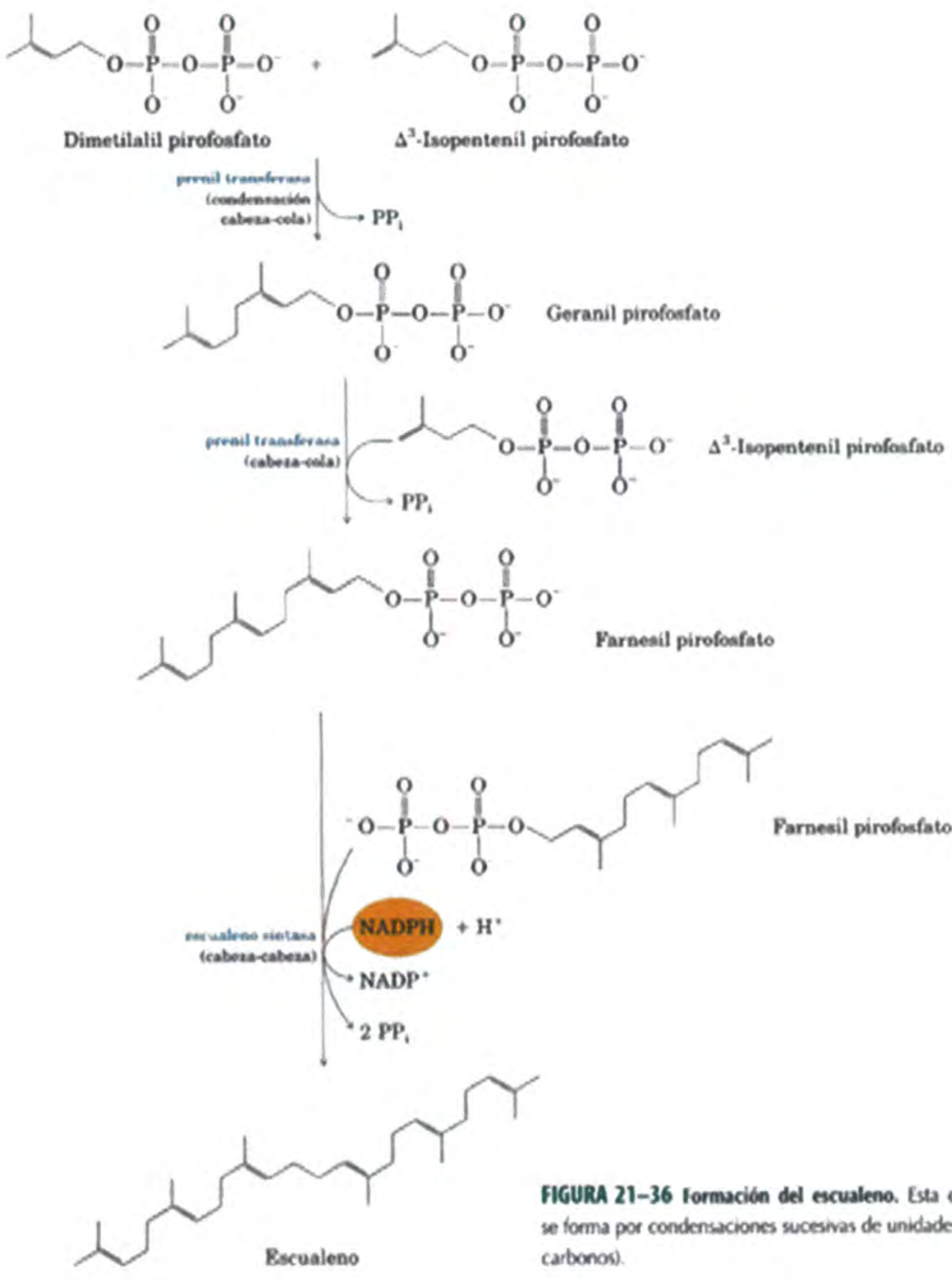


FIGURA 21-36 Formación del escualeno. Esta estructura de 30 carbonos se forma por condensaciones sucesivas de unidades de isopreno activo (cinco carbonos).

rol se convierte en colesterol en una serie de 20 reacciones que incluyen la migración de algunos grupos metilo y la eliminación de otros. La dilucidación de esta ruta biosintética, una de las más complejas que se conocen, fue llevada a cabo por Konrad Bloch, Feodor Lynen, John Cornforth y Georges Popják a finales de la década de 1950.

Konrad Bloch, 1912–2000

Feodor Lynen, 1911–1979

John Cornforth

George Popják, 1914–1998

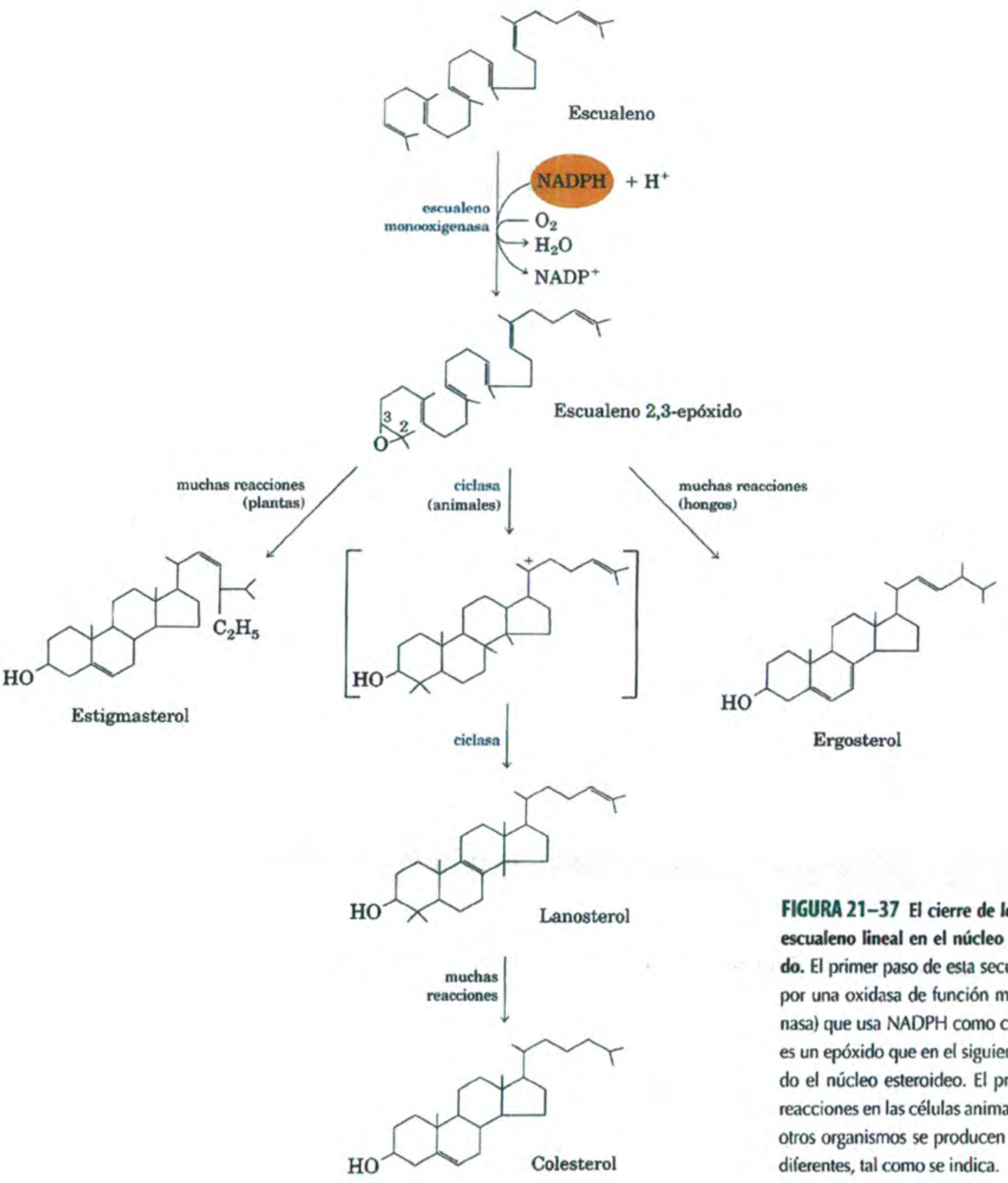


FIGURA 21–37 El cierre de los anillos convierte el escualeno lineal en el núcleo esteroideo condensado. El primer paso de esta secuencia está catalizado por una oxidasa de función mixta (una monooxigenasa) que usa NADPH como cosustrato. El producto es un epóxido que en el siguiente paso se cicla, dando el núcleo esteroideo. El producto final de estas reacciones en las células animales es el colesterol; en otros organismos se producen esteroles ligeramente diferentes, tal como se indica.

El colesterol es el esterol característico de las células animales; las plantas, hongos y protistas fabrican otros esteroles estrechamente relacionados utilizando la misma ruta biosintética hasta el escualeno 2,3-epóxido.

En este punto las rutas divergen ligeramente dando otros esteroles, tales como el estigmasterol en muchas plantas y el ergosterol en los hongos (Fig. 21–37).

EJEMPLO PRÁCTICO 21–1 Coste energético de la síntesis del escualeno

¿Cuál es el coste energético de la síntesis del escualeno a partir de acetil-CoA, expresado en número de ATP por molécula sintetizada?

Solución: En la ruta del acetil-CoA al escualeno sólo se consume ATP en los pasos que convierten el mevalonato en los precursores del escualeno, los isoprenos activados. Para la formación de cada uno de los seis isoprenos activados necesarios para sintetizar el escualeno se utilizan tres moléculas de ATP, es decir un coste total de 18 moléculas de ATP.

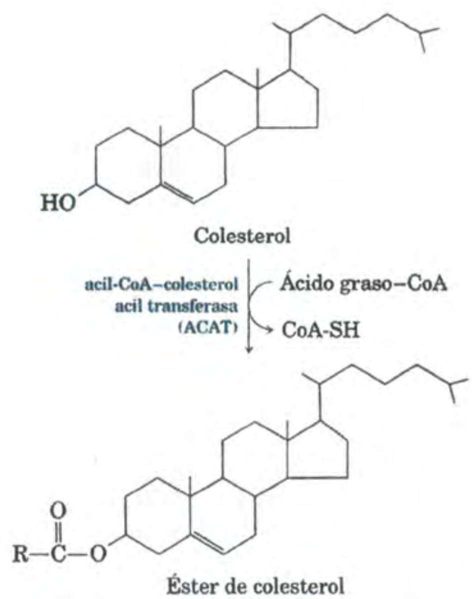


FIGURA 21–38 Síntesis de ésteres de colesterol. La esterificación convierte el colesterol en una forma todavía más hidrofóbica para su almacenamiento y transporte.

El colesterol tiene varios destinos

La mayor parte de la síntesis de colesterol en los vertebrados tiene lugar en el hígado. Una pequeña fracción del colesterol allí elaborado se incorpora a las membranas de los hepatocitos, pero la mayor parte se exporta en una de las tres formas siguientes: colesterol biliar, ácidos biliares o ésteres de colesterol. Los **ácidos biliares** y sus sales son derivados del colesterol relativamente hidrofílicos que se sintetizan en el hígado y ayudan a la digestión de los lípidos (véase la Fig. 17–1). Los **ésteres de colesterol** se forman en el hígado mediante la acción de la **acil-CoA-colesterol acil transferasa (ACAT).** Este enzima cataliza la transferencia de un ácido graso del coenzima A al grupo hidroxilo del colesterol **(Fig. 21–38)**, convirtiendo el colesterol en una forma más hidrofóbica. Los ésteres de colesterol se transportan en partículas de lipoproteínas secretadas hacia otros tejidos que utilizan colesterol o bien se almacenan en el hígado.

Todos los tejidos animales en crecimiento necesitan colesterol para la síntesis de membranas, y algunos órganos (glándula suprarrenal y gónadas, por ejemplo) utilizan colesterol como precursor para la producción de hormonas esteroideas (se describe más adelante). El colesterol es también un precursor de la vitamina D (véase la Fig. 10–20).

El colesterol y otros lípidos son transportados por lipoproteínas plasmáticas

El colesterol y sus ésteres, al igual que los triacilgliceroles y los fosfolípidos, son prácticamente insolubles en agua. No obstante, estos lípidos deben ser transportados desde el tejido de origen hasta los tejidos donde serán almacenados o consumidos. Son transportados en el plasma sanguíneo en forma de **lipoproteínas plasmáticas,** complejos macromoleculares de proteínas transportadoras específicas, denominadas **apolipoproteínas,** con diversas combinaciones de fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triacilgliceroles.

Las apolipoproteínas ("apo" designa la proteína en su forma libre de lípidos) se combinan con los lípidos para formar diversas clases de partículas lipoproteicas, complejos esféricos con lípidos hidrofóbicos en el núcleo y cadenas laterales hidrofílicas de aminoácidos de la proteína en la superficie **(Fig. 21–39a)**. Diferentes combinaciones de lípidos y proteínas dan lugar a partículas de densidades diferentes, que van desde los quilomicrones hasta las lipoproteínas de alta densidad. Estas partículas se pueden separar por ultracentrifugación (Tabla 21–1) y visualizarse por microscopia electrónica (Fig. 21–39b).

TABLA 21–1 Clases principales de lipoproteínas plasmáticas humanas: algunas propiedades

		Composición (% peso)				
Lipoproteína	**Densidad(g/mL)**	**Proteína**	**Fosfolípidos**	**Colesterol libre**	**Ésteres de colesterol**	**Triacilgliceroles**
Quilomicrones	<1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95–1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006–1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063–1,210	55	24	2	15	4

Fuente: Modificado de Kritchevsky, D. (1986) Atherosclerosis and nutrition. *Nutr. Int.* 2, 290-297.

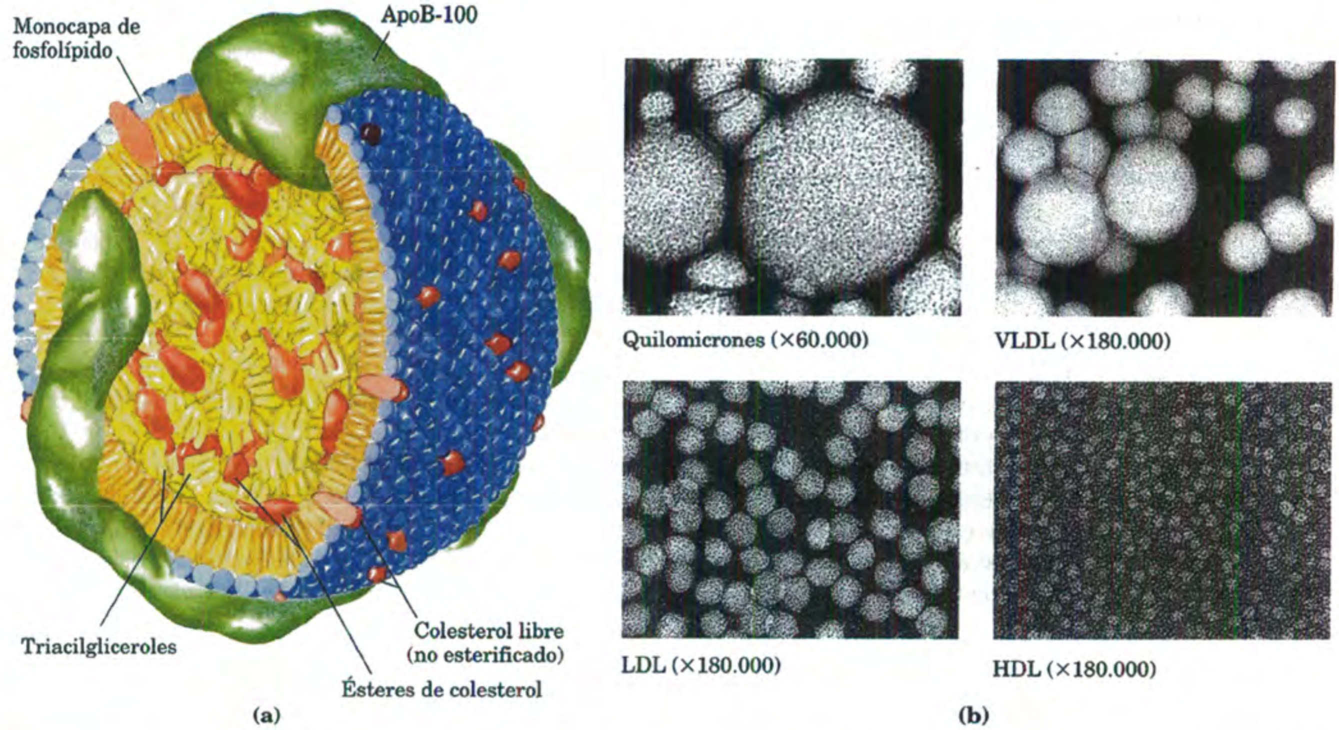


FIGURA 21–39 Lipoproteínas. **(a)** Estructura de una lipoproteína de densidad baja (LDL). La apolipoproteína B-100 (apoB-100) es una de las mayores cadenas polipeptídicas conocidas, con 4.636 residuos aminoácidos (M_r 513.000). Una partícula de LDL contiene un núcleo con unas 1.500 moléculas de ésteres de colesterol, rodeadas por una capa de 500 moléculas de colesterol, 800 moléculas de fosfolípidos y una molécula de apoB-100. **(b)** Cuatro clases de lipoproteínas visualizadas en el microscopio electrónico tras tinción negativa. Arriba a la izquierda, quilomicrones (50-200 nm de diámetro); arriba a la derecha, VLDL (28-70 nm); abajo a la izquierda, LDL (20-25 nm); abajo a la derecha, HDL (8-11 nm). Para las propiedades de las lipoproteínas, véase la Tabla 21–2.

Cada clase de lipoproteína tiene una función específica, determinada por su lugar de síntesis, composición lipídica y contenido en apolipoproteínas. En las lipoproteínas del plasma humano se encuentran al menos diez apolipoproteínas diferentes (Tabla 21–2). Las apolipoproteínas pueden diferenciarse por su tamaño, reacciones con anticuerpos específicos y distribución característica en las clases de lipoproteínas. Estos componentes proteicos actúan como señales, dirigiendo las lipoproteínas a tejidos específicos o como activadores de enzimas que actúan sobre las lipoproteínas.

TABLA 21–3 Apolipoproteínas de las lipoproteínas plasmáticas humanas

Apolipoproteína	Masa molecular	Lipoproteína asociada	Función (si se conoce)
ApoA-I	28.331	HDL	Activa la LCAT; interatúa con el transportador ABC
ApoA-II	17.380	HDL	Inhibe la LCAT
ApoA-IV	44.000	Quilomicrones, HDL	Activa la LCAT; transporte/eliminación de colesterol
ApoB-48	240.000	Quilomicrones	Transporte/eliminación de colesterol
ApoB-100	513.000	VLDL, LDL	Se une al receptor de LDL
ApoC-I	7.000	VLDL, HDL	
ApoC-II	8.837	Quilomicrones, VLDL, HDL	Activa la lipoproteína lipasa
ApoC-III	8.751	Quilomicrones, VLDL, HDL	Inhibe la lipoproteína lipasa
ApoD	32.500	HDL	
ApoE	34.145	Quilomicrones, VLDL, HDL	Desencadena la eliminación de VLDL y quilomicrones residuales

Fuente: Modificado de Vance, D.E. & Vance, J.E. (eds) (1985) *Biochemistry of Lipids and Membranes*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA.

Los **quilomicrones,** discutidos en el Capítulo 17 en conexión con el movimiento de los triacilgliceroles de la dieta desde el intestino a otros tejidos, son las lipoproteínas de mayor tamaño y menor densidad, y contienen una elevada proporción de triacilgliceroles (véase la Fig. 17–2). Los quilomicrones se sintetizan en el RE de las células epiteliales que recubren el intestino delgado y a continuación se trasladan por el sistema linfático hasta entrar en el torrente circulatorio a través de la vena subclavia izquierda. Entre las apolipoproteínas de los quilomicrones se cuentan la apoB-48 (que sólo se encuentra en esta clase de lipoproteínas), la apoE y la apoC-II (Tabla 21–2). La apoC-II activa la lipoproteína lipasa en los capilares de los tejidos adiposo, cardíaco, muscular esquelético y mamario en época de lactación, permitiendo la liberación de ácidos grasos a estos tejidos. De este modo los quilomicrones transportan los ácidos grasos de la dieta hasta los tejidos en donde serán almacenados o consumidos como combustible **(Fig. 21–40).** Los quilomicrones residuales (desprovistos de la mayor parte de sus triacilgliceroles, pero que todavía contienen colesterol, apoE y apoB-48) se mueven a través del torrente sanguíneo hasta el hígado. Receptores hepáticos se unen a la apoE de los quilomicrones residuales y facilitan su captación por endocitosis. En el hígado los quilomicrones residuales ceden su colesterol y se degradan en los lisosomas.

Cuando la dieta contiene más ácidos grasos de los que son necesarios inmediatamente como combustible, se convierten en triacilgliceroles en el hígado y se empaquetan con apolipoproteínas específicas formando las **lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL,** "very low-density lipoproteins"). El exceso de glúcidos en la dieta también se puede convertir en triacilgliceroles en el hígado, exportándose en forma de VLDL (Fig. 21–40a). Además de los triacilgliceroles, las VLDL contienen algo de colesterol y ésteres de colesterol, así como apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III y apoE (Tabla 21–2). Estas lipoproteínas se transportan en la sangre desde el hígado al músculo y al tejido adiposo, donde la activación de la lipoproteína lipasa por la apoC-II produce la liberación de los ácidos grasos de los triacilgliceroles de las VLDL. Los adipocitos captan

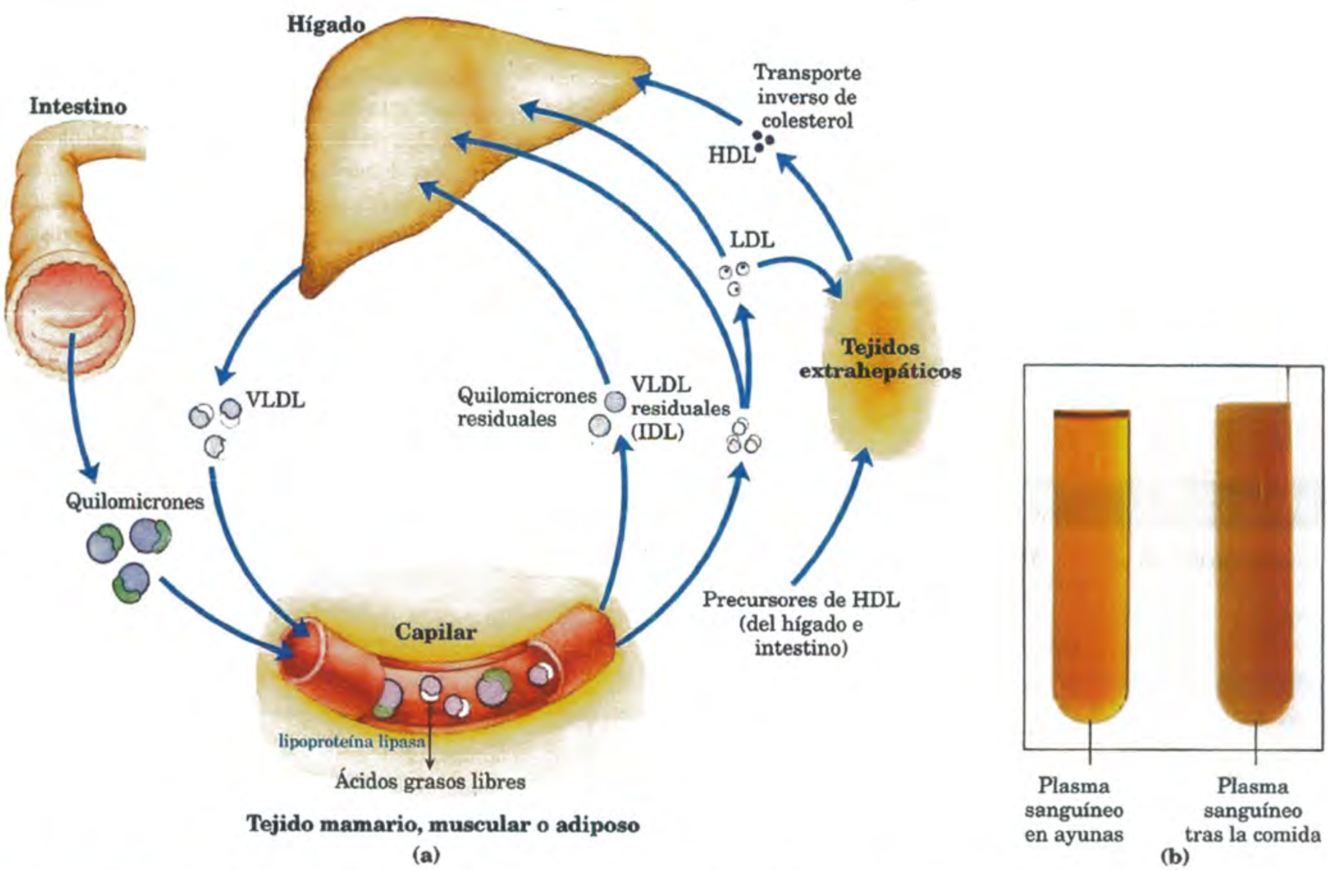


FIGURA 21–40 Lipoproteínas y transporte de lípidos. (a) Los lípidos son transportados en el torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas, de las que hay varios tipos con diferentes funciones, diferentes composiciones en lípidos y proteínas (véanse las Tablas 21–1 y 21–2) y, por tanto, diferentes densidades. Los lípidos de la dieta se empaquetan en los quilomicrones; la mayor parte de su contenido en triacilgliceroles es liberado por la lipoproteína lipasa en los tejidos adiposo y muscular durante el transporte a través de los capilares. Los quilomicrones residuales (que contienen principalmente proteína y colesterol) son captados por el hígado. Los lípidos endógenos y el colesterol del hígado se envían al tejido adiposo y muscular con la VLDL. La extracción de lípidos de la VLDL (junto con la pérdida de algunas apolipoproteínas) la convierten gradualmente en LDL, que transfiere el colesterol a los tejidos extrahepáticos o vuelve al hígado. El hígado capta LDL, VLDL residuales (llamadas lipoproteínas de densidad intermedia, o IDL) y quilomicrones residuales por un proceso de endocitosis facilitada por receptor. El exceso de colesterol en los tejidos extrahepáticos se transporta de nuevo al hígado en forma de HDL. En el hígado parte del colesterol se convierte en sales biliares. **(b)** Muestras de plasma sanguíneo recogidas en ayunas (izquierda) o después de una comida rica en grasas (derecha). Los quilomicrones producidos después de una comida grasa dan al plasma un aspecto lechoso.

RECUADRO 21–2 MEDICINA **Los alelos de la apoE predicen la incidencia de la enfermedad de Alzheimer**

En la población humana existen tres variantes comunes, o alelos, del gen que codifica la apolipoproteína E. El más común, que representa aproximadamente el 78% de los alelos humanos de apoE, es el *APOE3*; los alelos *APOE4* y *APOE2* representan el 15% y 7%, respectivamente. El alelo *APOE4* es especialmente común en humanos que presentan la enfermedad de Alzheimer, siendo la relación altamente predictiva. Los individuos que han heredado el alelo *APOE4* tienen un riesgo superior de padecer la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía. Los que son homozigotos para el alelo *APOE4* tienen un riesgo 16 veces superior de desarrollar la enfermedad; para los que la desarrollan la edad media de aparición está justo por debajo de los 70 años. Los individuos que han heredado dos copias del alelo *APOE3*, en cambio, tienen una edad media de inicio de la enfermedad de Alzheimer superior a los 90 años.

Las bases moleculares de la asociación entre la apoE-4 y la enfermedad de Alzheimer todavía no son bien conocidas. Tampoco se conoce con certeza de qué modo la proteína apoE-4 podría afectar el crecimiento de las fibras de amiloide, que parecen ser los agentes causales primarios del Alzheimer (véase la Fig. 4–31).

Algunos investigadores han especulado sobre el posible papel que desempeña la apoE en la estabilización de la estructura del citoesqueleto de las neuronas. Las proteínas apoE-2 y apoE-3 se unen a numerosas proteínas asociadas a los microtúbulos neuronales, pero no en cambio a la apoE-4. Este hecho podría acelerar la muerte de las neuronas. Cualquiera que sea el mecanismo, estas observaciones prometen ampliar nuestro conocimiento de las funciones biológicas que desempeñan las apolipoproteínas.

estos ácidos grasos, los vuelven a convertir en triacilgliceroles y los almacenan en gotículas lipídicas intracelulares; los miocitos, por el contrario, oxidan mayoritariamente los ácidos grasos para obtener energía. La mayor parte de las VLDL residuales se eliminan de la circulación gracias los hepatocitos. Al igual que con los quilomicrones, la captación está facilitada por un receptor y depende de la presencia de apoE en la VLDL residual. (El Recuadro 21–2 describe una conexión entre apoE y la enfermedad de Alzheimer.)

La pérdida de triacilgliceroles convierte parte de las VLDL en VLDL residuales (también denominadas lipoproteínas de densidad intermedia, IDL, "intermediate-density lipoproteins"); la pérdida adicional de triacilgliceroles de las VLDL produce **lipoproteínas de densidad baja (LDL,** "low-density lipoproteins") (Tabla 21-1). Muy ricas en colesterol y ésteres de colesterol, y con apoB-100 como principal apolipoproteína, las LDL transportan el colesterol hasta los tejidos extrahepáticos que tienen receptores específicos de membrana que reconocen la apoB-100. Estos receptores intervienen en la captación de colesterol y de ésteres de colesterol en un proceso descrito más adelante.

El cuarto tipo principal de lipoproteínas, **lipoproteínas de densidad alta (HDL,** "high-density lipoproteins"), se sintetizan en el hígado y el intestino delgado como partículas pequeñas, ricas en proteína, que contienen relativamente poco colesterol y nada de sus ésteres (Fig. 21–40). Las HDL contienen apoA-I, apoC-I, apoC-II y otras apolipoproteínas (Tabla 21–2), además del enzima **lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT),** que cataliza la formación de ésteres de colesterol a partir de lecitina (fosfatidilcolina) y colesterol **(Fig. 21–41)**. La LCAT en la superficie de las partículas de HDL nacientes (que se están formando) convierte el colesterol y la fosfatidilcolina de los quilomicrones y de las VLDL residuales en ésteres de colesterol, los cuales empiezan a formar un núcleo, transformando la HDL naciente, que tiene forma discoidal, en una partícula esférica de HDL madura. Esta lipoproteína rica en colesterol retorna ahora al hígado, donde descarga el colesterol; parte de este colesterol se convierte en sales biliares.

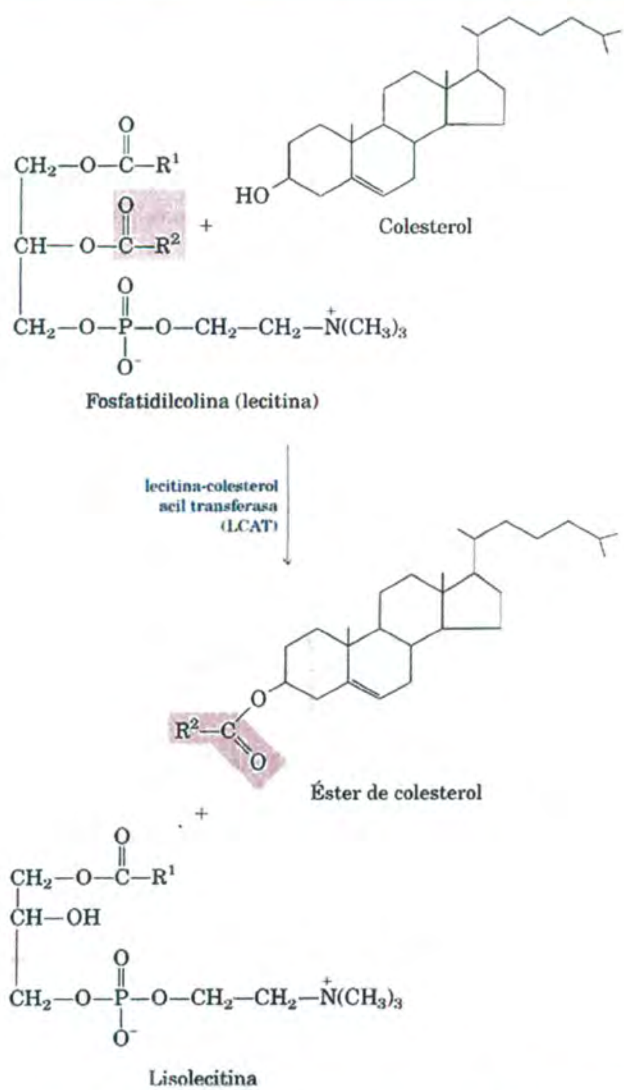


FIGURA 21–41 Reacción catalizada por la lecitina-colesterol acilo transferasa (LCAT). Este enzima está presente en la superficie de las HDL y es estimulado por el componente de la HDL apoA-I. Los ésteres de colesterol se acumulan en las HDL nacientes convirtiéndolas en HDL maduras.

Las HDL pueden ser captadas por el hígado mediante endocitosis facilitada por receptor, pero al menos parte del colesterol de las HDL se libera en otros tejidos por un mecanismo nuevo. Las HDL pueden unirse a receptores proteicos de membrana, llamados SR-BI, en el hígado y en tejidos esteroidogénicos tales como las glándulas suprarrenales. Estos receptores no actúan mediante endocitosis, sino mediante una transferencia parcial y selectiva del colesterol y otros lípidos de la HDL al interior de la célula. La HDL desprovista de lípidos se disocia y vuelve a la circulación sanguínea y extrae más lípidos de los quilomicrones y las VLDL residuales. Esta HDL sin lípidos puede también captar colesterol almacenado en los tejidos extrahepáticos y transportarlo hacia el hígado, en las rutas del **transporte inverso de colesterol** (Fig. 21–40). En una ruta de transporte inverso la interacción de la HDL naciente con los receptores SR-BI de células ricas en colesterol desencadena un movimiento pasivo del colesterol desde la superficie celular hacia la HDL, que lo transporta de nuevo hacia el hígado. En una segunda ruta, la apoA-I de la HDL pobre en lípidos interacciona con un transportador activo, la proteína ABC1, en una célula rica en colesterol. La apoA-I (y quizá la HDL) es captada por endocitosis y vuelta a secretar cargada de colesterol, que es transportado al hígado.

La proteína ABC1 es un miembro de una gran familia de transportadores de múltiples fármacos, denominados a veces transportadores ABC porque todos ellos tienen "cassettes" de unión a ATP ("*ATP-binding cassette*"); también presentan dos dominios transmembrana con seis hélices transmembrana (Capítulo 11). Estas proteínas transportan activamente diversos iones, aminoácidos, vitaminas, hormonas esteroideas y sales biliares a través de las membranas plasmáticas. La proteína CFTR, defectuosa en la fibrosis quística (véase el Recuadro 11–3), es otro miembro de esta familia ABC de transportadores de múltiples medicamentos.

Los ésteres de colesterol entran en las células por endocitosis facilitada por receptor

Cada partícula de LDL en el torrente sanguíneo contiene apoB-100, que es reconocida por proteínas receptoras específicas de superficie, los **receptores de LDL,** en las células que necesitan captar colesterol. La unión de la LDL a su receptor inicia la endocitosis, que lleva la LDL y su receptor asociado al interior de la célula dentro de un endosoma **(Fig. 21–42)**. El endosoma se fusiona finalmente con un lisosoma, que contiene enzimas que hidrolizan los ésteres de colesterol, liberando ácidos grasos y colesterol al citosol. La apoB-100 de la LDL también se degrada, dando aminoácidos que se liberan al citosol, pero el receptor de LDL escapa a la degradación y vuelve a la superficie celular para funcionar de nuevo en la captación de LDL. La apoB-100 está también presente en la VLDL, pero su dominio de unión al re-

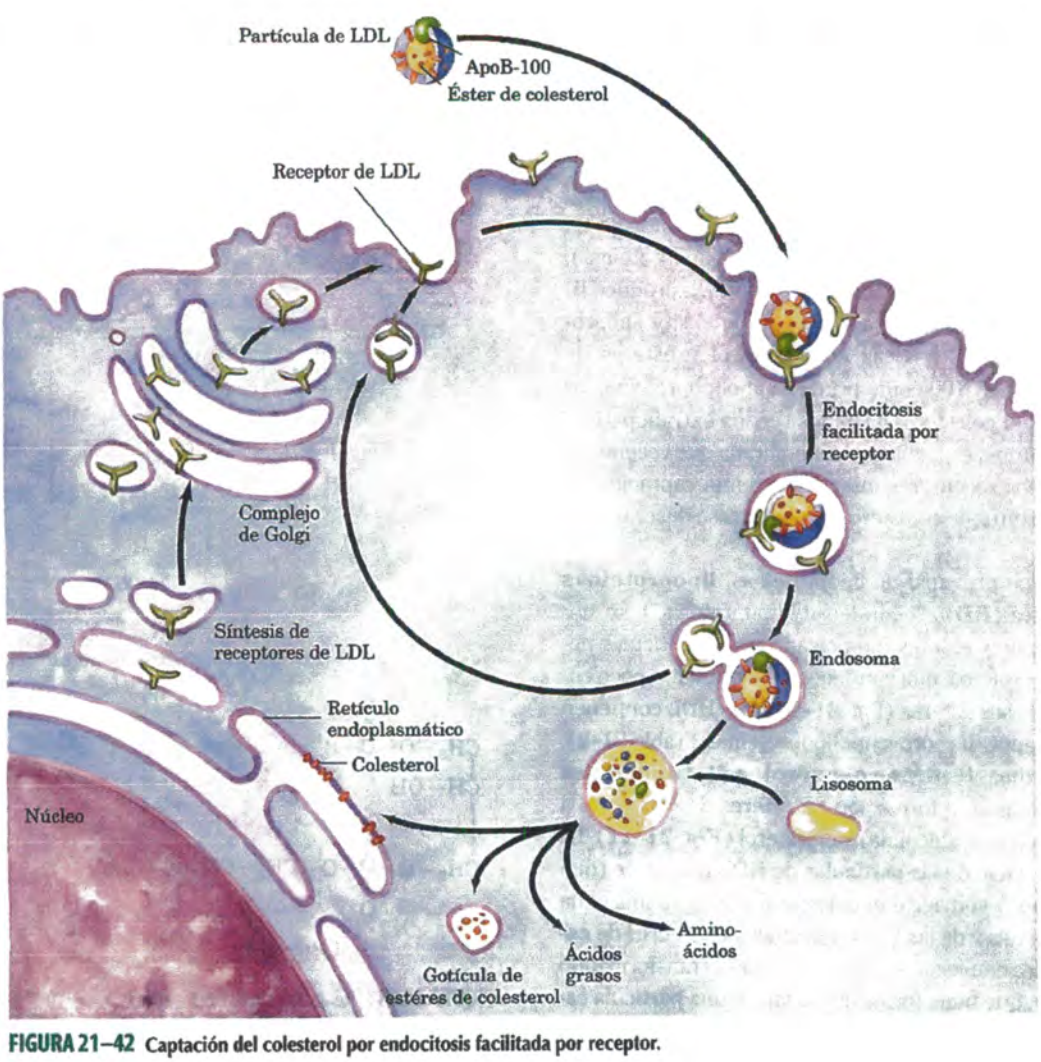


FIGURA 21–42 Captación del colesterol por endocitosis facilitada por receptor.

ceptor no es accesible para unirse al receptor de LDL; la conversión de la VLDL en LDL expone el dominio de unión al receptor de la apoB-100. Esta ruta de transporte de colesterol en la sangre y su **endocitosis facilitada por receptor** en los tejidos diana fue dilucidada por Michael Brown y Joseph Goldstein.

Michael Brown y Joseph Goldstein

El colesterol que entra en las células por esta ruta puede incorporarse a las membranas o ser reesterificado por la ACAT (Fig. 21–38) para su almacenamiento en gotículas de lípido citosólicas. La acumulación de un exceso de colesterol intracelular se evita por reducción de la velocidad de su síntesis cuando puede obtenerse suficiente colesterol de la LDL de la sangre.

El receptor de LDL une también apoE y tiene un papel importante en la captación hepática de quilomicrones y VLDL residuales. Sin embargo, cuando no existen receptores de LDL (como por ejemplo en una cepa de ratón que carece del gen del receptor de LDL), las VLDL residuales y los quilomicrones aún pueden ser captados por el hígado, aunque no así la LDL. Esto indica que existe un sistema de soporte para la endocitosis facilitada por receptor de las VLDL residuales y los quilomicrones. Un receptor de soporte es la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas (LRP, "*l*ipoprotein *r*eceptor-related *p*rotein"), que une apoE, así como otros numerosos ligandos.

La biosíntesis del colesterol está regulada a diversos niveles

La síntesis de colesterol es un proceso complejo y energéticamente caro, por lo que es ventajoso para un organismo poder regular la biosíntesis del colesterol de modo que complemente la ingestión del mismo en la dieta. En los mamíferos la producción de colesterol está regulada por su concentración intracelular y por las hormonas glucagón e insulina. El paso limitante de la velocidad de la ruta hacia el colesterol (y un sitio principal de regulación) es la conversión del HMG-CoA en mevalonato (Fig. 21–34), reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa.

La regulación en respuesta a la concentración de colesterol tiene lugar mediante un elegante sistema de regulación de la transcripción del gen que codifica la HMG-CoA reductasa. Este gen, junto con más de otros 20 genes codificadores de enzimas que intervienen en la captación y síntesis del colesterol y de ácidos grasos insaturados, está controlado por una pequeña familia de proteínas denominadas proteínas de unión del elemento regulador de esteroles (SREBP). Inmediatamente después de su síntesis estas proteínas están incrustadas en el RE. Sólo el dominio amino-terminal soluble de una SREBP funciona como activador de la transcripción mediante mecanismos que se discuten en el Capítulo 28. No obstante, este dominio no tiene acceso al núcleo, por lo que no puede participar en la activación génica mientras continúa formando parte de la molécula de SREBP. Para activar la transcripción del gen de la HMG-CoA reductasa y otros genes, se separa el dominio activo sobre la transcripción del resto de la SREBP mediante corte proteolítico. Cuando los niveles de colesterol son elevados, las SREBP son inactivas, retenidas en el RE por otra proteína denominada proteína activadora del corte de la SREBP (SCAP) **(Fig. 21–43)**. Es la SCAP la que une el colesterol y otros esteroles diversos, actuando de este modo como un sensor de esteroles. Cuando los niveles de esteroles son elevados, el complejo SCAP-SREBP interacciona probablemente con otra proteína que retiene todo el complejo en el RE. Cuando disminuye el nivel de esteroles en la célula, un cambio de conformación en la SCAP produce la liberación del complejo SCAP-SREBP de su retención en el RE y el complejo migra dentro de vesículas hasta el complejo de Gol-

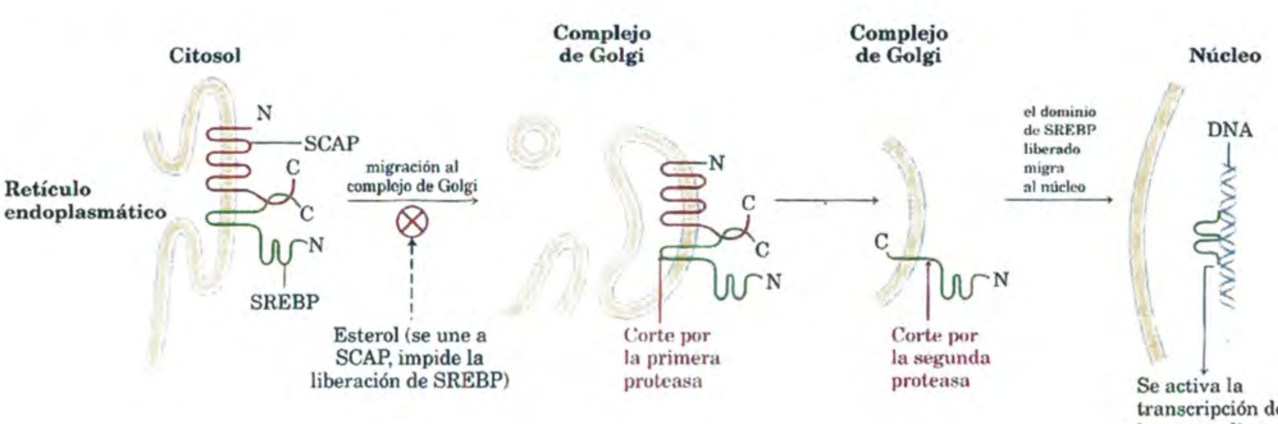


FIGURA 21–43 Activación de las SREBP. Las proteínas de unión al elemento regulador por esteroles (SREBP, en verde) se incrustan en el RE cuando son sintetizadas formando un complejo con la proteína activadora del corte de las SREBP (SCAP, rojo). (N y C representan los extremos amino- y carboxi-terminales de las proteínas.) Las SREBP son inactivas cuando se encuentran unidas a SCAP. Cuando desciende la concentración de esteroles, el complejo migra hacia el complejo de Golgi y las SREBP son cortadas sucesivamente por dos proteasas. El dominio amino-terminal de las SREBP que se ha liberado migra hacia el núcleo, en donde activa la transcripción de genes regulados por esteroles.

gi. Allí la SREBP es cortada dos veces por dos proteasas diferentes. El segundo corte libera el dominio amino-terminal al citosol. Este dominio se desplaza hasta el núcleo y activa la transcripción de sus genes diana. El dominio amino-terminal de las SREBP tiene una vida media corta, degradándose rápidamente por los proteasomas (véase la Fig. 27–48). Cuando los niveles de esteroles aumentan suficientemente, vuelve a bloquearse la liberación proteolítica de los dominios amino-terminales de las SREBP, con lo que la rápida degradación por el proteasoma de los dominios activos existentes da lugar a una desconexión rápida de los genes diana.

Existen varios mecanismos que también regulan la síntesis de colesterol **(Fig. 21–44)**. El control hormonal se consigue por modificación covalente de la propia HMG-CoA reductasa. El enzima existe en forma fosforilada (inactiva) o desfosforilada (activa). El glucagón estimula la fosforilación (inactivación), mientras que la insulina promueve la desfosforilación activando el enzima y favoreciendo la síntesis de colesterol. Concentraciones intracelulares elevadas de colesterol activan la ACAT, que aumenta la esterificación de colesterol para su almacenamiento.

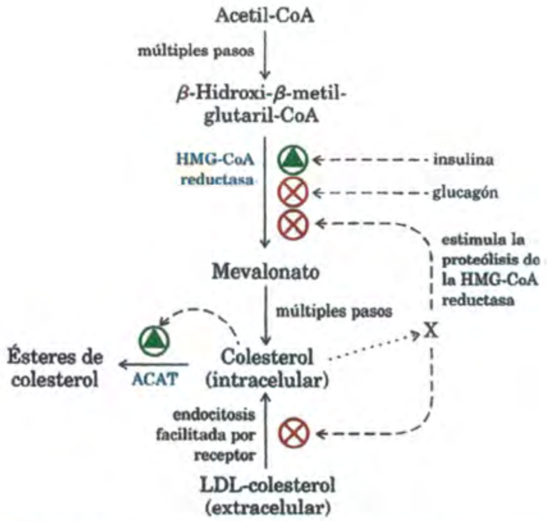


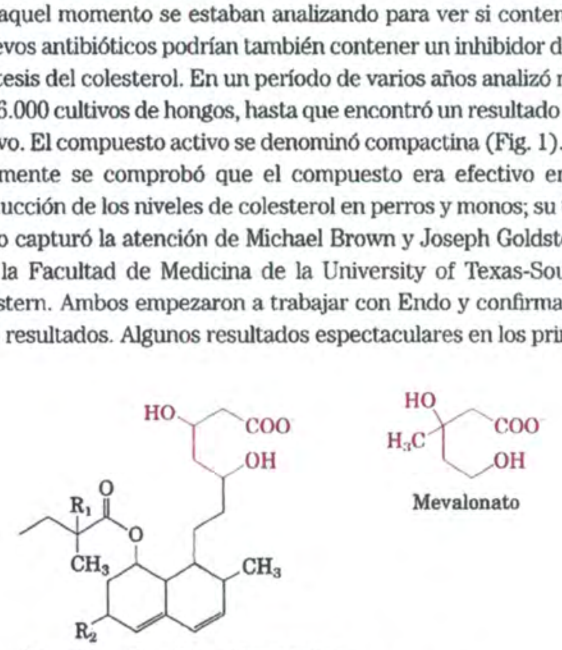
FIGURA 21–44 La regulación de la biosíntesis del colesterol equilibra la síntesis con la ingestión por la dieta. El glucagón promueve la fosforilación (inactivación) de la HMG-CoA reductasa, y la insulina la desfosforilación (activación). X son metabolitos no identificados del enzima que estimulan la proteólisis.

RECUADRO 21–3 MEDICINA La hipótesis lipídica y el desarrollo de las estatinas

La enfermedad de las arterias coronarias del corazón es la causa principal de muerte en los países desarrollados. Las arterias coronarias que llevan sangre al corazón se estrechan debido a la formación de depósitos grasos denominados placas ateroescleróticas (que contienen colesterol, proteínas fibrosas, depósitos de calcio, plaquetas de la sangre y restos celulares). El establecimiento de una conexión entre la oclusión arterial (aterosclerosis) y los niveles de colesterol en sangre fue un proyecto del siglo XX que desencadenó una disputa que sólo se resolvió con el desarrollo de medicamentos efectivos en la disminución de los niveles de colesterol.

En 1913, N.N. Anitschkov, un patólogo experimental de San Petersburgo, Rusia, publicó un estudio en el que demostraba que los conejos alimentados con una dieta rica en colesterol desarrollaban lesiones muy similares a las placas aterosclеóticas vistas en los humanos ancianos. Anitschkov continuó sus trabajos durante unas décadas más publicando sus resultados en importantes revistas occidentales. No obstante, no se aceptó el trabajo como modelo de la aterosclerosis humana debido a la visión existente de que la enfermedad era un consecuencia simple del envejecimiento, por lo que no podía prevenirse. La asociación entre colesterol sérico y aterosclerosis (la hipótesis lipídica) fue reforzándose hasta que en la década de 1960 algunos investigadores sugirieron abiertamente que la intervención terapéutica podría ser útil. No obstante, la controversia persistió hasta que en 1984 se publicaron los resultados de un gran estudio de disminución del colesterol, financiado por los National Institutes of Health de Estados Unidos: el Coronary Primary Prevention Trial. Este estudio demostró de manera concluyente una disminución estadísticamente significativa de los ataques de corazón y embolias como resultado de la disminución del nivel de colesterol. Se utilizó una resina de unión de ácidos biliares, la colestiramina, para controlar el colesterol. Los resultados propulsaron una investigación para disponer de intervenciones terapéuticas más efectivas. Aún persistió cierta controversia hasta el desarrollo de las estatinas a finales de la década de 1980 y principios de la de 1990.

El doctor Akira Endo, que trabajaba en la compañía Sankyo de Tokyo, descubrió la primera estatina; el trabajo se publicó en 1976. Endo estaba interesado desde hacía algún tiempo en el metabolismo del colesterol y especuló en 1971 que hongos que en aquel momento se estaban analizando para ver si contenían nuevos antibióticos podrían también contener un inhibidor de la síntesis del colesterol. En un período de varios años analizó más de 6.000 cultivos de hongos, hasta que encontró un resultado positivo. El compuesto activo se denominó compactina (Fig. 1). Finalmente se comprobó que el compuesto era efectivo en la reducción de los niveles de colesterol en perros y monos; su trabajo capturó la atención de Michael Brown y Joseph Goldstein, de la Facultad de Medicina de la University of Texas-Southwestern. Ambos empezaron a trabajar con Endo y confirmaron sus resultados. Algunos resultados espectaculares en los prime-



$R_1 = H$	$R_2 = H$	Compactina
$R_1 = CH_3$	$R_2 = CH_3$	Simvastatina (Zocor)
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	Pravastatina (Pravachol)
$R_1 = H$	$R_2 = CH_3$	Lovastatina (Mevacor)

FIGURA 1 Inhibidores de la HMG-CoA reductasa. Comparación de las estructuras del mevalonato y cuatro compuestos farmacéuticos que inhiben la HMG-CoA reductasa.

Finalmente, un nivel de colesterol celular elevado disminuye la transcripción del gen que codifica el receptor de la LDL, reduciendo la producción de receptores y por tanto la captación de colesterol desde la sangre.

La producción no regulada de colesterol puede ser causa de enfermedad humana grave. Cuando la suma del colesterol sintetizado y el obtenido de la dieta supera la cantidad requerida para la síntesis de membranas, sales biliares y esteroides, se pueden desarrollar acumulaciones patológicas de colesterol en los vasos sanguíneos (placas ateroscleróticas) con el resultado de la obstrucción de estos vasos **(aterosclerosis).** Los fallos cardíacos debidos a la oclusión de las arterias coronarias son una causa principal de muerte en las sociedades industrializadas. La aterosclerosis está ligada a los niveles elevados de colesterol en sangre, y especialmente con los niveles elevados de colesterol asociado a la LDL; existe una correlación *negativa* entre los niveles de HDL y la enfermedad arterial.

En la hipercolesterolemia familiar, una enfermedad genética humana, los niveles de colesterol en la sangre son muy elevados, y los individuos afectados desarrollan aterosclerosis grave desde la niñez. El receptor de LDL es defectuoso en estos individuos, con lo que no se produce la captación, facilitada por receptor del colesterol transportado por la LDL. En consecuencia, el colesterol no es eliminado de la circulación; se acumula y contribuye a la formación de placas ateroscleróticas. La síntesis endógena de colesterol continúa a pesar del exceso de colesterol en la sangre, debido a que el colesterol extracelular no puede entrar en la célula para regular la síntesis intracelular (Fig. 21–44). Una clase de fármacos denominados **estatinas,** algunos aislados de fuentes naturales y otros sintetizados por la industria farmacéutica, se usan en el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia familiar y otras enfermedades en las que la concentración de colesterol en el suero es elevada. Las estatinas se parecen al mevalonato (Recuadro 21–3) y son inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa.

Los niveles de HDL son muy bajos en humanos con deficiencia familiar de HDL, y casi indetectables en la enfermedad de Tangier. Estas dos enfermedades genéticas son el resultado de mutaciones en la proteína ABC1. La HDL desprovista de colesterol no puede captar el colesterol de las células que carecen

Akira Endo

Alfred Alberts

P. Roy Vagelos

ros ensayos clínicos limitados convencieron a varios laboratorios farmacéuticos a unirse en la búsqueda de estatinas. Un equipo de Merck liderado por Alfred Alberts y P. Roy Vagelos empezó a analizar cultivos de hongos encontrando un resultado positivo tan sólo después de analizar 18 cultivos. La nueva estatina se denominó lovastatina (Fig. 1). El rumor de que la compactina a dosis muy elevadas era carcinogénica en perros casi hizo abandonar la carrera para el desarrollo de las estatinas en 1980, pero los beneficios para los pacientes con hipercolesterolemia familiar eran ya evidentes. Después de amplias consultas con expertos de todo el mundo y la Food and Drug Administration de Estados Unidos, Merck procedió a desarrollar la lovastatina con muchas precauciones. Pruebas exhaustivas realizadas en las dos décadas siguientes revelaron que ni la lovastatina ni ninguna de las demás estatinas de nuevas generaciones aparecidas desde entonces tenían efectos carcinogénicos.

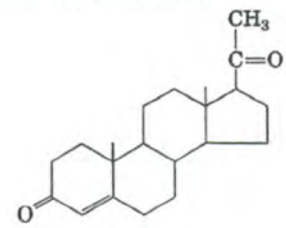
Las estatinas inhiben la HMG-CoA reductasa en parte por similitud con la estructura del mevalonato (Fig. 1), con lo que inhiben la síntesis del colesterol. El tratamiento con lovastatina reduce el colesterol sérico hasta en un 30% en individuos con hipercolesterolemia debida a tener una copia defectuosa del gen del receptor de la LDL. Cuando se combina con una resina administrada por vía oral que une ácidos biliares e impide su reabsorción en el intestino, el fármaco es incluso más efectivo.

En el momento actual las estatinas son los medicamentos más utilizados para rebajar los niveles de colesterol sérico. Los efectos secundarios siempre preocupan con los fármacos pero las estatinas representan un caso en el que muchos de los efectos secundarios son positivos. Estos medicamentos pueden mejorar el flujo sanguíneo, aumentan la estabilidad de las placas ateroesleróticas (con lo que no se rompen obstruyendo el flujo sanguíneo), reducen la agregación plaquetaria y reducen la inflamación vascular. Algunos de estos efectos tienen lugar antes de que disminuyan los niveles de colesterol en pacientes que toman estatinas por primera vez; puede que ello esté relacionado con una inhibición secundaria de la síntesis de isoprenoides por parte de las estatinas. No todos los efectos de las estatinas son positivos. Unos pocos pacientes, normalmente entre los que toman estatinas en combinación con otros medicamentos que disminuyen el colesterol, experimentan dolor o debilidad muscular que puede convertirse en grave e incluso debilitante. Se ha observado un número más bien elevado de efectos secundarios en pacientes, si bien la mayoría son raros. No obstante, para la inmensa mayoría de pacientes la disminución de los riesgos asociados con la enfermedad coronaria debidos al uso de estatinas puede ser espectacular. Al igual que con todos los medicamentos, las estatinas deben utilizarse bajo prescripción y control del médico.

de la proteína ABC1, por lo que la HDL pobre en colesterol es rápidamente eliminada de la sangre y destruida. La deficiencia familiar de HDL y la enfermedad de Tangier son muy raras (se conocen menos de 100 familias con la enfermedad de Tangier en todo el mundo), pero su existencia de ha establecido un papel para la proteína ABC1 en la regulación de los niveles plasmáticos de HDL. Dado que los niveles bajos de HDL se correlacionan con una alta incidencia de enfermedad arterial coronaria, la proteína ABC1 podría ser una diana útil para el desarrollo de medicamentos que controlen los niveles de HDL. ■

Las hormonas esteroideas se forman por rotura de la cadena lateral y oxidación del colesterol

Todas las hormonas esteroideas humanas son derivados del colesterol **(Fig. 21–45)**. En la corteza de la glándula suprarrenal se sintetizan dos clases de hormonas esteroideas: los **mineralocorticoides,** que controlan la reabsorción de los iones inorgánicos (Na^+, Cl^- y HCO_3^-) por el riñón, y los **glucocorticoides,** que ayudan a regular la gluconeogénesis y reducen la respuesta inflamatoria. Las hormonas sexuales se sintetizan en las gónadas masculinas y femeninas y en la placenta. Incluyen la **progesterona,** que regula el ciclo reproductor femenino, y los **andrógenos** (como la testosterona) y los **estrógenos** (como el estradiol), que influyen en el desarrollo de las características sexuales secundarias en varones y hembras, respectivamente. Las hormonas esteroideas son efectivas a concentraciones muy bajas y por tanto se sintetizan en cantidades relativamente pequeñas. En comparación con las sales biliares, su producción consume relativamente poco colesterol.



Progesterona

La síntesis de las hormonas esteroideas requiere la eliminación de alguno o todos los carbonos de la "cadena lateral" en C-17 del anillo D del colesterol. La eliminación de la cadena lateral tiene lugar en las mitocondrias de los tejidos que producen esteroides. La eliminación **(Fig. 21–46)** implica la hidroxila-

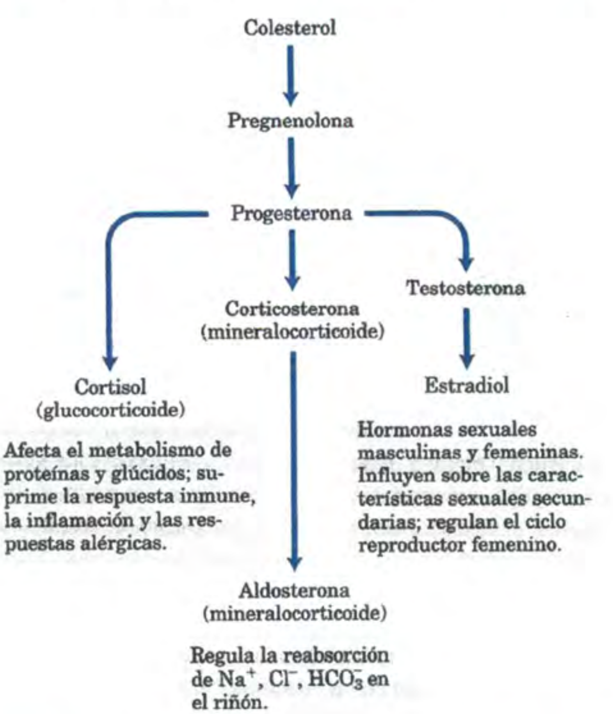


FIGURA 21–45 Algunas hormonas esteroides derivadas del colesterol. Las estructuras de algunos de estos compuestos se muestran en la Figura 10–19.

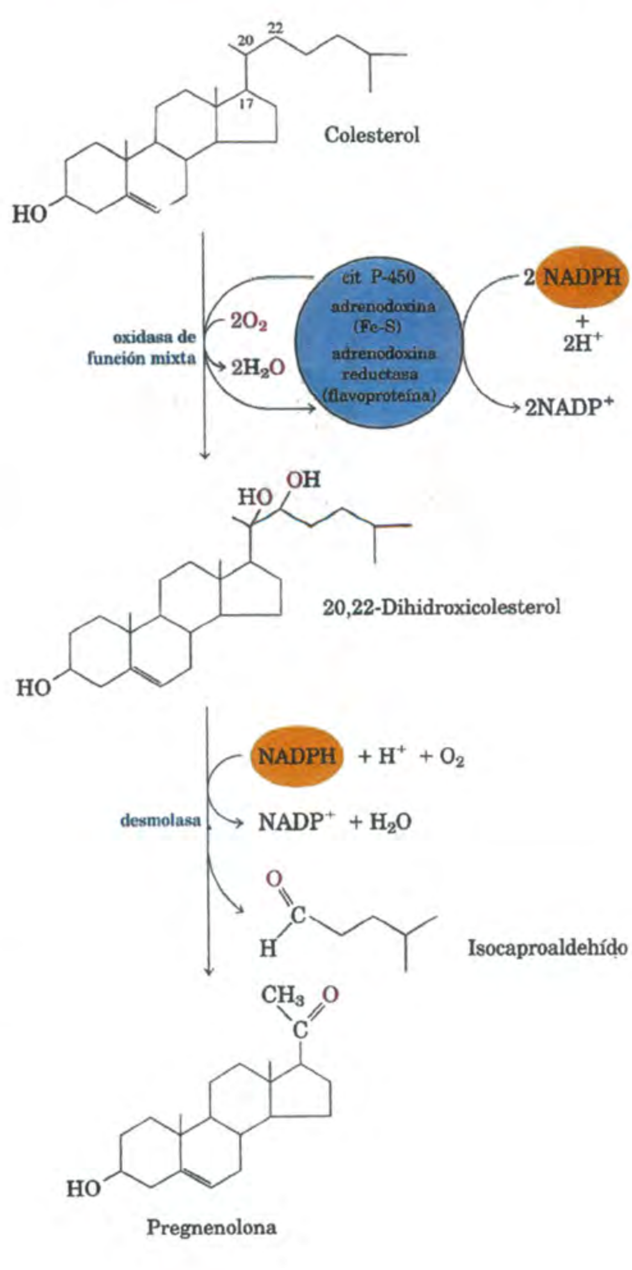


FIGURA 21–46 Corte de la cadena lateral en la síntesis de las hormonas esteroideas. El citocromo P-450 actúa como transportador de electrones en este sistema de oxidasa de función mixta que oxida carbonos adyacentes. El proceso también requiere las proteínas de transferencia de electrones adrenodoxina y adrenodoxina reductasa. Este sistema de corte de cadenas laterales se encuentra en las mitocondrias de la corteza suprarrenal, donde hay una producción muy activa de esteroides. La pregnenolona es el precursor de las restantes hormonas esteroideas. (véase la Fig. 21–45).

ción de dos carbonos adyacentes de la cadena lateral (C-20 y C-22), seguida de la rotura del enlace entre ellos. En la formación de las diferentes hormonas también se introducen átomos de oxígeno. Todas las reacciones de hidroxilación y oxigenación de la biosíntesis de esteroides están catalizadas por oxidasas de función mixta (Recuadro 21–1) que utilizan NADPH, O_2 y el citocromo mitocondrial P-450.

Los intermediarios de la síntesis del colesterol tienen muchos destinos alternativos

Además de su papel como intermediario en la biosíntesis del colesterol, el isopentenil pirofosfato es el precursor activado de un conjunto muy grande de biomoléculas con diversas funciones biológicas **(Fig. 21–47)**. Entre ellas se cuentan las vitaminas A, E y K; pigmentos vegetales tales como los carotenos y la cadena de fitol de la clorofila; el caucho natural; muchos aceites esenciales (tales como las esencias del aceite de limón, eucalipto y almizcle); la hormona juvenil de los insectos que controla la metamorfosis; los dolicoles que actúan como transportadores liposolubles en la síntesis de polisacáridos complejos, y la ubiquinona y la plastoquina, transportadores electrónicos en la mitocondria y los cloroplastos. En conjunto, todas estas moléculas se denomina isoprenoides. En la naturaleza se han descubierto más de 20.000 moléculas isoprenoides diferentes, y otros cientos aparecen cada año.

La prenilación (unión covalente de un isoprenoide; véase la Fig. 27–35) es un mecanismo común por el que las proteínas son ancladas a la superficie interna de las membranas celulares de mamíferos (véase la Fig. 11–14). En alguna de estas proteínas el lípido unido es el grupo farnesilo de 15 carbonos; otras tienen el grupo geranilgeranilo de 20 carbonos. Diferentes enzimas unen los dos tipos de lípidos. Es posible que las reacciones de prenilación dirijan las proteínas a diferentes membranas según sea el lípido que se ha unido. La prenilación de proteínas es otro papel importante de los derivados isopreno de la ruta del colesterol.

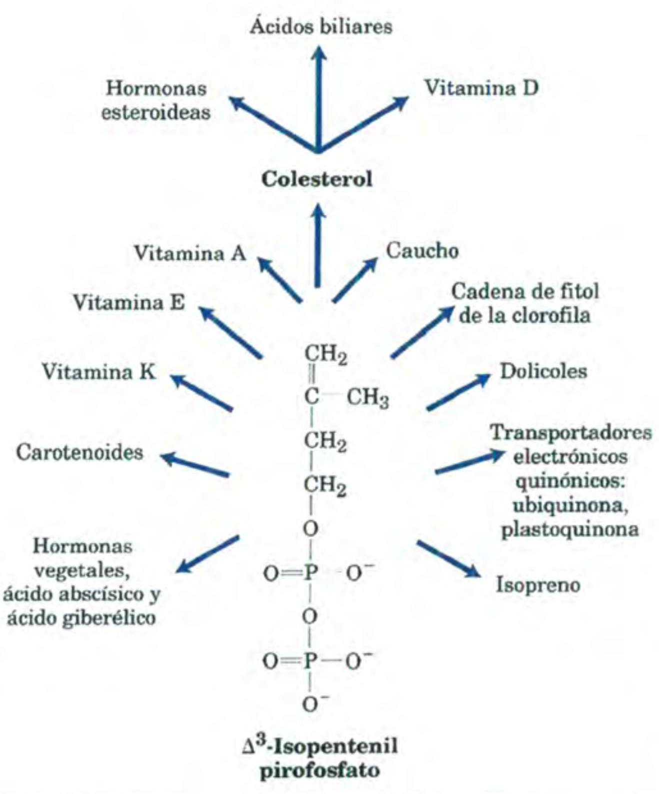


FIGURA 21–47 Visión general de la biosíntesis de isoprenoides. Las estructuras de la mayoría de productos finales mostrados se encuentran en el Capítulo 10.

RESUMEN 21.4 Biosíntesis de colesterol, esteroides e isoprenoides

- El colesterol se forma a partir del acetil-CoA en una serie compleja de reacciones a través de los intermediarios β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA, mevalonato y dos isoprenos activados, el dimetilalil pirofosfato y el isopentenil pirofosfato. La condensación de unidades de isopreno produce el compuesto acíclico escualeno, que se cicla para dar el sistema anular esteroideo y una cadena lateral.
- La síntesis de colesterol está bajo control hormonal y también es inhibida por concentraciones intracelulares de colesterol elevadas que actúan a través de mecanismos de modificación covalente y regulación de la transcripción.
- El colesterol y sus ésteres son transportados en la sangre en lipoproteínas plasmáticas. Las VLDL transportan colesterol, ésteres de colesterol y triacilgliceroles desde el hígado a otros tejidos, en donde los triacilgliceroles se degradan por la lipoproteína lipasa, convirtiéndose las VLDL en LDL. Las LDL, ricas en colesterol y sus ésteres, son captadas por endocitosis facilitada por receptor, en la que la apolipoproteína B-100 de la LDL es reconocida por receptores de la membrana plasmática. La HDL elimina el colesterol de la sangre transportándolo hasta el hígado. Las condiciones de la dieta o defectos genéticos en el metabolismo del colesterol pueden producir aterosclerosis y enfermedad cardíaca.
- Las hormonas esteroideas (glucocorticoides, mineralocorticoides y hormonas sexuales) se forman a partir del colesterol por alteración de la cadena lateral y la introducción de átomos de oxígeno en el sistema de anillos esteroideo. Además del colesterol existe una gran cantidad de compuestos isoprenoides derivados del mevalonato mediante condensaciones del isopentenil pirofosfato y el dimetilalil pirofosfato.
- La prenilación de ciertas proteínas las destina a asociarse con membranas celulares, lo que es esencial para su actividad biológica.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

malonil-CoA 805
acetil-CoA carboxilasa 805
ácido graso sintasa 806
proteína transportadora de acilos (ACP) 808
acil graso–CoA desaturasa 815
oxidasas de función mixta 815
ácidos grasos esenciales 815
oxigenasas de función mixta 816
citocromo P-450 816

Bibliografía

Las referencias generales de los Capítulos 10 y 17 también son útiles.

General

Bell, S.J., Bradley, D., Forse, R.A., & Bistrian, B.R. (1997) The new dietary fats in health and disease. *J. Am. Dietetic Assoc.* **97**, 280–286.

Hajjar, D.P. & Nicholson, A.C. (1995) Atherosclerosis. *Am. Sci.* **83**, 460–467.

Una buena descripción de la base molecular de esta enfermedad y perspectivas terapéuticas.

Ohlrogge, J. & Browse, J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 957–970.

Buen resumen de las rutas de biosíntesis de lípidos en plantas.

Vance, D.E. & Vance, J.E. (eds) (1996) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes,* New Comprehensive Biochemistry, Vol. 31, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Revisiones sobre la estructura, biosíntesis y función de los lípidos.

Biosíntesis de ácidos grasos e icosanoides

Capdevila, J.H., Falck, J.R., & Estabrook, R.W. (1992) Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J.* **6**, 731–736.

Este número contiene 20 artículos sobre la estructura y función de diversos citocromos P-450.

Creelman, R.A. & Mullet, J.E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 355–381.

Drazen, J.M., Israel, E., & O'Byrne, P.M. (1999) Drug therapy: treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *New Engl. J. Med.* **340**, 197–206.

Jenni, S., Leibundgut, M., Maier, T., & Ban, N. (2006) Architecture of a fungal fatty acid synthase at 5 Å resolution. *Science* **311**, 1263–1267.

Lands, W.E.M. (1991) Biosíntesis de prostaglandins. *Annu. Rev. Nutr.* **11**, 41–60.

Discusión de los requerimientos nutricionales de ácidos grasos insaturados y de trabajos bioquímicos recientes sobre la ruta desde el araquidonato a las prostaglandinas.

Maier, T., Jenni, S., & Ban, N. (2006) Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* **311**, 1258–1262.

Los grandes complejos multiproteicos que sintetizan ácidos grasos en hongos tienen arquitecturas interesantes y muy diferentes en comparación con las de mamíferos.

Munday, M.R. (2002) Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1059–1064.

Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M. & Hanson, R.M. (2003) Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* **278**, 30,413–30,416.

Warner, T.D. & Mitchell, J.A. (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* **18**, 790–804.

White, S.W., Zheng, J., Zhang, Y.-M., & Rock, C.O. (2005) The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 791–831.

Biosíntesis de fosfolípidos de membrana

Bishop, W.R. & Bell, R.M. (1988) Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 579–610.

Revisión avanzada de la enzimología y biología celular de la síntesis y destino de fosfolípidos.

Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199–232.

Hanada, K. (2006) Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking. *Mol. Cell. Biochem.* **286**, 23–31.

Kennedy, E.P. (1962) The metabolism and function of complex lipids. *Harvey Lect.* **57**, 143–171.

Descripción clásica del papel de los nucleótidos de citidina en la síntesis de fosfolípidos.

Pavlidis, P., Ramaswami, M., & Tanouye, M.A. (1994) The *Drosophila easily shocked* gene: a mutation in a phospholipid synthetic pathway causes seizure, neuronal failure, and paralysis. *Cell* **79**, 23–33.

Descripción de los efectos fascinantes del cambio de composición de los lípidos de membrana en la mosca del vinagre.

Raetz, C.R.H. & Dowhan, W. (1990) Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 1235–1238.

Revisión breve de la biosíntesis bacteriana de fosfolípidos y lipopolisacáridos.

Biosíntesis de colesterol, esteroides e isoprenoides

Bittman, R. (ed.) (1997) *Subcellular Biochemistry,* Vol. 28: *Cholesterol: Its Functions and Metabolism in Biology and Medicine,* Plenum Press, New York.

Bloch, K. (1965) The biological synthesis of cholesterol. *Science* **150**, 19–28.

Conferencia de recepción del Premio Nobel por el autor; descripción clásica de la síntesis del colesterol en animales.

Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11,041–11,048.

Chang, T.Y., Chang, C.C.Y., & Cheng, D. (1997) Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 613–638.

Edwards, P.A. & Ericsson, J. (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 157–185.

Gimpl, G., Burger, K., & Fahrenholz, F. (2002) A closer look at the cholesterol sensor. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 596–599.

Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425–430.

Descripción de la regulación alostérica y covalente de los enzimas de la ruta del mevalonato; incluye una breve descripción de la prenilación de Ras y otras proteínas.

Knopp, R.H. (1999) Drug therapy: drug treatment of lipid disorders. *New Engl. J. Med.* **341**, 498–511.

Revisión sobre el uso de inhibidores de la HMG-CoA y de resinas que unen ácidos biliares para reducir el colesterol en suero..

Krieger, M. (1999) Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 523–558.

McGarvey, D.J. & Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015–1026.

Descripción de la enorme diversidad de isoprenoides en plantas.

Olson, R.E. (1998) Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.* **128** (2 Suppl.), 439S–443S.

Relato claro y resumido de los antecedentes históricos en la función de las lipoproteínas..

Russell, D.W. (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 137–174.

Steinberg, D. (2006) An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: The discovery of the statins and the end of the controversy. *J. Lipid Res.* **47**, 1339–1351.

Última de una serie en cinco partes en que se describe con detalle la historia de la controversia sobre lípidos que condujo al desarrollo de las estatinas.

Young, S.G. & Fielding, C.J. (1999) The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet.* **22**, 316–318.

Breve revisión de tres artículos en el mismo número de esta revista, en los que se establece que las mutaciones en ABC1 producen la enfermedad de Tangier y la deficiencia familiar en HDL.

Problemas

1. Ruta del carbono en la síntesis de ácidos grasos Utilizando sus conocimientos sobre la biosíntesis de ácidos grasos dé una explicación plausible para las siguientes observaciones experimentales:

(a) La adición de [^{14}C]acetil-CoA marcado de manera uniforme a una fracción soluble de hígado da palmitato marcado uniformemente con ^{14}C.

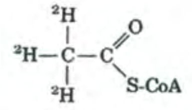
(b) Sin embargo, la adición de *pequeñas cantidades* de [^{14}C]acetil-CoA marcado uniformemente en presencia de un exceso de malonil-CoA sin marcar a una fracción soluble de hígado forma palmitato marcado sólo con ^{14}C en C-15 y C-16.

2. Síntesis de ácidos grasos a partir de glucosa Después de que una persona haya ingerido grandes cantidades de sacarosa, la glucosa y fructosa en exceso de sus requerimientos calóricos se transforman en ácidos grasos para la síntesis de triacilgliceroles. Esta síntesis de ácidos grasos consume acetil-CoA, ATP y NADPH: ¿Cómo se producen estas sustancias a partir de la glucosa?

3. Ecuación neta de la síntesis de ácidos grasos Escriba la ecuación neta de la biosíntesis de palmitato en el hígado de rata, empezando con el acetil-CoA mitocondrial y NADPH, ATP y CO_2 citosólicos.

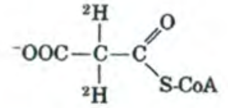
4. Ruta del hidrógeno en la síntesis de ácidos grasos Considere una preparación que contiene todos los enzimas y cofactores necesarios para la biosíntesis de ácidos grasos a partir de acetil-CoA y malonil-CoA añadidos.

(a) Si se añaden [2-^{2}H]acetil-CoA (marcado con deuterio, isótopo pesado del hidrógeno)



y un exceso de malonil-CoA sin marcar como sustratos, ¿cuántos átomos de deuterio se incorporarán en cada molécula de palmitato? ¿Cuáles serán las localizaciones de dichos átomos deuterio? Explíquelo.

(b) Si se añaden como sustrato acetil-CoA sin marcar y [2-^{2}H]malonil-CoA,



¿cuántos átomos de deuterio se incorporarán en cada molécula de palmitato? ¿Cuáles serán las localizaciones de dichos átomos deuterio? Explíquelo.

5. Energética de la β-cetoacil-ACP sintasa En la reacción de condensación catalizada por la β-cetoacil-ACP sintasa (véase la Fig. 21–6) se sintetiza una unidad de cuatro carbonos por combinación de una unidad de dos carbonos y una de tres carbonos con liberación de CO_2. ¿Cuál es la ventaja termodinámica de este proceso sobre uno que simplemente combine dos unidades de dos carbonos?

6. Modulación de la acetil-CoA carboxilasa La acetil-CoA carboxilasa constituye el punto de regulación principal en la biosíntesis de ácidos grasos. Algunas de las propiedades del enzima se describen a continuación:

(a) La adición de citrato o isocitrato aumenta la V_{max} del enzima en un factor de hasta 10.

(b) El enzima existe en dos formas interconvertibles que difieren marcadamente en sus actividades:

$$\text{Protómero (inactivo)} \rightleftharpoons \text{polímero filamentoso (activo)}$$

El citrato y el isocitrato se fijan preferentemente a la forma filamentosa mientras que el palmitil-CoA se fija preferentemente al protómero.

Explique por qué estas propiedades están de acuerdo con el papel regulador de la acetil-CoA carboxilasa en la biosíntesis de ácidos grasos.

7. Paso de los grupos acetilo a través de la membrana mitocondrial interna El grupo acetilo del acetil-CoA, producido por la descarboxilación oxidativa del piruvato en la mitocondria, se transfiere al citosol por la lanzadera del grupo acetilo descrita en la Figura 21–10.

(a) Escriba la ecuación global para la transferencia de un grupo acetilo desde la mitocondria al citosol.

(b) ¿Cuál es el coste de este proceso en ATP por grupo acetilo?

(c) En el Capítulo 17 encontramos una lanzadera de grupo acilo en la transferencia de acil graso-CoA desde el citosol hasta la mitocondria en preparación de su β-oxidación (véase la Fig. 17–6). Un resultado de tal lanzadera es la separación de los fondos de CoA mitocondrial y citosólico. ¿Se cumple esto también en el caso de la lanzadera del grupo acetilo? Explíquelo detalladamente.

8. Necesidades de oxígeno de las desaturasas La biosíntesis del palmitoleato (véase la Fig. 21–12), un ácido graso insaturado común con un doble enlace en *cis* en la posición Δ^9, utiliza palmitato como precursor. ¿Puede tener lugar la síntesis de palmitoleato en condiciones estrictamente anaeróbicas? Explíquelo.

9. Coste energético de la síntesis de triacilgliceroles Utilice una ecuación neta para la biosíntesis de tripalmitilglicerol (tripalmitina) a partir de glicerol y palmitato para demostrar cuántos ATP se requieren por molécula de tripalmitina formada.

10. Recambio de triacilgliceroles en el tejido adiposo Cuando se añade $[^{14}C]$glucosa a la dieta equilibrada de ratas adultas no se produce incremento en la cantidad de triacilgliceroles almacenados a pesar de que los triacilgliceroles quedan marcados con $[^{14}C]$. Explíquelo.

11. Coste energético de la síntesis de fosfatidilcolina Escriba la secuencia de pasos y la reacción neta para la biosíntesis de fosfatidilcolina por la ruta de recuperación a partir de oleato, palmitato, dihidroxiacetona fosfato y colina. Empezando con estos precursores, ¿cuál es el coste (en número de ATP) de la síntesis de fosfatidilcolina por la ruta de recuperación?

12. Ruta de recuperación para la síntesis de fosfatidilcolina Una rata joven mantenida con una dieta deficiente en metionina no sobrevive a menos que se le incluya colina en la dieta. Explíquelo.

13. Síntesis de isopentenil pirofosfato Si se añade 2 $[^{14}C]$acetil-CoA a un homogenado de hígado de rata que está sintetizando colesterol, ¿en dónde aparecerá la marca de ^{14}C en el Δ^3-isopentenil pirofosfato, la forma activada de una subunidad de isopreno?

14. Dadores activados en la síntesis de lípidos En la biosíntesis de lípidos complejos, los componentes se unen mediante transferencia del grupo adecuado a partir de un dador activado. Por ejemplo, el dador activado de grupos acetilo es el acetil-CoA. Para cada uno de los grupos siguientes, indique la forma del dador activado: (a) fosfato; (b) D-glucosilo; (c) fosfoetanolamina; (d) D-galactosilo; (e) acilo graso; (f) metilo; (g) el grupo de dos carbonos de la síntesis de ácidos grasos; (h) Δ^3-isopentenilo.

15. Importancia de las grasas en la dieta Cuando se someten ratas jóvenes a una dieta totalmente libre de grasas crecen poco, desarrollan dermatitis escamosa, pierden el pelo y mueren pronto, síntomas que pueden evitarse si se incluye en la dieta linoleato o materia vegetal. ¿Qué es lo que hace que el linoleato sea un ácido graso esencial? ¿Por qué la materia vegetal es un sustituto?

16. Regulación de la biosíntesis de colesterol El colesterol en humanos se puede obtener de la dieta o ser sintetizado de novo. Un humano adulto que siga una dieta baja en colesterol sintetiza normalmente 600 mg de colesterol por día en el hígado. Si la cantidad de colesterol en la dieta es grande, la síntesis de novo del colesterol se reduce drásticamente. ¿Cómo se da esta regulación?

17. Disminución de los niveles séricos de colesterol con estatinas Los pacientes tratados con un fármaco del grupo de las estatinas muestran generalmente una disminución espectacular del colesterol sérico. Sin embargo, la cantidad del enzima HMG-CoA reductasa presente en las células puede aumentar de manera sustancial. Sugiera una explicación para este efecto.

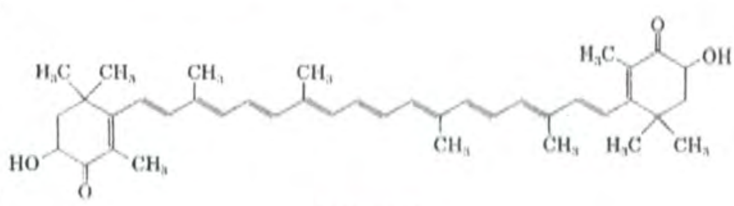
18. Función de los ésteres tiólicos en la biosíntesis del colesterol Dibuje un mecanismo para cada una de las tres reacciones que se muestran en la Figura 21-34, detallando la ruta de síntesis del mevalonato a partir de acetil-CoA.

19. Efectos secundarios potenciales del tratamiento con estatinas Aunque aún no se han realizado ensayos clínicos que documenten los beneficios o efectos secundarios, algunos médicos han sugerido que los pacientes tratados con estatinas tomen también un suplemento de coenzima Q. Sugiera las razones de esta recomendación.

Problema de análisis de datos

20. Modificación genética de *E. coli* para producir grandes cantidades de isoprenoide En la naturaleza existe una enorme variedad de isoprenoides, algunos de los cuales son importantes médica o comercialmente y que se producen a escala industrial. Entre los métodos de producción se incluyen la síntesis enzimática in vitro que es un proceso caro y con un bajo rendimiento. En 1999, Wang, Oh y Liao publicaron sus experimentos para modificar genéticamente la bacteria *E. coli*, de fácil de cultivo, para producir grandes cantidades de astaxantina, un isoprenoide de importancia comercial.

La astaxantina es un pigmento carotinoide (un antioxidante) producido por algas marinas. Animales marinos tales como las gambas, las langostas y algunos peces que se alimentan de algas obtienen su color anaranjado de la astaxantina ingerida. La astaxantina está compuesta de ocho unidades de isopreno; su fórmula molecular es $C_{40}H_{52}O_4$:



Astaxantina

(a) Señale con círculos las ocho unidades isopreno de la molécula de astaxantina. (Pista: Utilice los grupos metilo salientes como guía.)

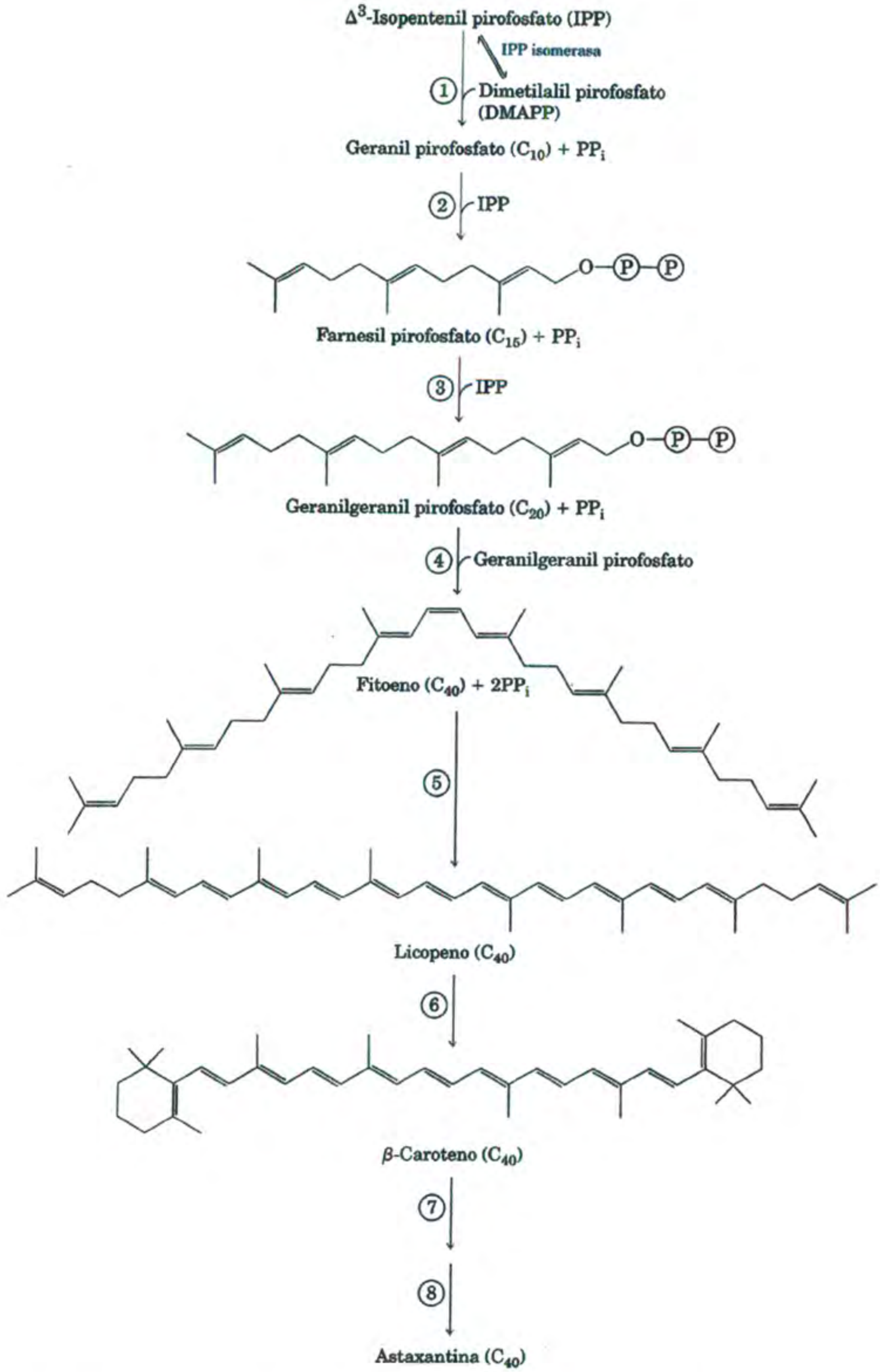
La astaxantina se sintetiza a través de la ruta que se muestra en la página de al lado, empezando con Δ^3-isopentenil pirofosfato (IPP). Los pasos ① y ② se muestran en la Figura 21-36 y la reacción catalizada por la IPP isomerasa se muestra en la Figura 21–35.

(b) En el paso ④ de esta ruta, se unen dos moléculas de geranil pirofosfato formando fitoeno. ¿Es ésta una unión cabeza-cabeza o cabeza-cola? (Antes de responder, véase la Figura 21–36 para detalles.)

(c) Describa brevemente la transformación química del paso ⑤.

(d) En la síntesis del colesterol (Fig. 21–37) se produce una ciclación (cierre de anillos) en la que hay una oxidación neta por O_2. ¿La ciclación en el paso ⑥ de la ruta sintética de la astaxantina requiere una oxidación neta del sustrato (licopeno)? Explique su razonamiento.

E. coli no produce grandes cantidades de muchos isoprenoides y no sintetiza astaxantina. Se sabe que sintetiza pequeñas cantidades de IPP, DMAPP, geranil pirofosfato, farnesil pirofosfato y geranilgeranil pirofosfato. Wang y colaboradores clonaron diversos genes de *E. coli* que codifican enzimas necesarios para la síntesis de astaxantina en plásmidos que permiten



su sobreexpresión. Entre estos genes se cuentan *idi*, que codifica la IPP isomerasa e *ispA* que codifica una prenil transferasa que cataliza los pasos ① y ②.

Para modificar genéticamente una *Escherichia coli* que sea capaz de la ruta completa de la astaxantina, Wang y colaboradores clonaron diversos genes de otras especies de bacterias en plásmidos que permitiesen la sobreexpresión en *E. coli*. Entre estos genes se encontraban *crtE* de *Erwinia uredovora*, que codifica un enzima que cataliza el paso ③, y *crtB, crtI, crtY, crtZ y crtW* de *Agrobacterium aurantiacum*, genes que codifican los enzimas de los pasos ④, ⑤, ⑥, ⑦ y ⑧, respectivamente.

Los investigadores también clonaron los genes *gps* de *Archaeoglobus fulgidus*, sobreexpresaron este gen en *E. coli* y extrajeron el producto génico. Cuando se hizo reaccionar este extracto con [^{14}C]IPP y DMAPP o geranil pirofosfato o farnesil pirofosfato, sólo se produjo en todos los casos geranilgernail pirofosfato marcado con ^{14}C.

(e) Según en estos datos, ¿qué pasos de la ruta están catalizados por el enzima codificado en *gps*? Razone su respuesta.

Wang y colaboradores prepararon seguidamente varias cepas de *E. coli* que sobreexpresaban diferentes genes y midieron el color naranja de las colonias (las colonias de tipo salvaje de *E. coli* son de color hueso) y la cantidad de astaxantina producida.

Estos resultados se muestran a continuación.

Cepa	Gen(es) sobreexpresado(s)	Color naranja	Rendimiento de astaxantina (μg/g de peso seco)
1	*crtBIZYW*	–	ND
2	*crtBIZYW, ispA*	–	ND
3	*crtBIZYW, idi*	–	ND
4	*crtBIZYW, idi, ispA*	–	ND
5	*crtBIZYW, crtE*	+	32,8
6	*crtBIZYW, crtE, ispA*	+	35,3
7	*crtBIZYW, crtE, idi*	++	234,1
8	*crtBIZYW, crtE, idi, ispA*	+++	390,3
9	*crtBIZYW, gps*	+	35,6
10	*crtBIZYW, gps, idi*	+++	1.418,8

Nota: ND, no determinado

(f) Si compara los resultados de las cepas 1 a 4 con los de las cepas 5 a 8, ¿qué puede concluir sobre el nivel de expresión de un enzima capaz de catalizar el paso ③ de la ruta sintética de la astaxantina en *E. coli* de tipo salvaje? Razone la respuesta.

(g) Basándose en los datos anteriores, ¿cuál cree que es el enzima limitante de velocidad de la ruta de síntesis de astaxantina, la IPP isomerasa o bien el enzima codificado en *idi*? Explique su razonamiento.

(h) ¿Esperaría que una cepa con sobreexpresión de *crtBIZYW*, *gps* y *crtE* produjese niveles de astaxantina bajos (+), medios (++) o altos (+++) según las medidas de la coloración naranja? Explíquelo.

Referencia

Wang, C.-W., Oh, M.-K., & Liao, J.C. (1999) Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 235–241.

> El tiempo pasa rápidamente cuando uno se divierte. La emoción de ver gente a la que le van bien las cosas cuando, de otro modo, podrían haber muerto de enfermedad . . . no se puede describir con palabras. El Premio Nobel sólo fue la guinda del pastel.
>
> —*Gertrude Elion, citada en un artículo de* Science, *2002*

22

Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas

El nitrógeno se halla tan sólo por detrás del carbono, el hidrógeno y el oxígeno por su contribución a la masa de los seres vivos. La mayor parte de este nitrógeno forma parte de aminoácidos y nucleótidos. En este capítulo estudiaremos todos los aspectos del metabolismo de los compuestos que contienen nitrógeno, excepto el catabolismo de los aminoácidos, descrito en el Capítulo 18.

La exposición conjunta de las rutas biosintéticas que conducen a la formación de los aminoácidos y los nucleótidos está justificada no sólo porque ambas clases de moléculas contienen nitrógeno (que procede de fuentes biológicas comunes), sino también porque los dos conjuntos de vías están considerablemente interconectados, con varios intermediarios clave comunes. Ciertos aminoácidos, o partes de aminoácidos, se incorporan a la estructura de las purinas y de las pirimidinas, y en un caso parte de un anillo de purina se incorpora a la estructura de un aminoácido (la histidina). Los dos conjuntos de vías metabólicas también comparten buena parte de sus características químicas, en especial la preponderancia de las reacciones de transferencia de nitrógeno o de grupos monocarbonados.

Las vías que se describen aquí pueden intimidar al estudiante que se inicie en el estudio de la bioquímica. Su complejidad proviene no tanto de los propios procesos químicos, que en general son bien comprendidos, sino del gran número de pasos y de la variedad de los intermediarios. La mejor manera de abordar estas vías consiste en no perder de vista los principios metabólicos ya discutidos, los precursores e intermediarios clave y los tipos comunes de reacciones que tienen lugar. Incluso un rápido repaso de la química puede resultar útil, pues algunas de las transformaciones químicas menos habituales de los sistemas biológicos se encuentran en estas vías metabólicas; así, hay ejemplos destacados del uso biológico poco habitual de los metales molibdeno, selenio y vanadio. El esfuerzo realizado tiene su recompensa, sobre todo para los estudiantes de medicina o veterinaria. Muchas enfermedades genéticas descritas en humanos y animales se deben a la ausencia de uno o más enzimas del metabolismo de aminoácidos y nucleótidos y muchos fármacos utilizados comúnmente para combatir enfermedades infecciosas son inhibidores de enzimas de estas vías, así como muchos de los agentes más importantes en la quimioterapia del cáncer.

La regulación es crucial en la biosíntesis de los compuestos que contienen nitrógeno. Puesto que los aminoácidos y los nucleótidos son requeridos en cantidades relativamente pequeñas, el flujo metabólico a través de la mayoría de estas vías no tiene la magnitud del flujo biosintético de las vías de los glúcidos o de las grasas en los tejidos animales. Pero puesto que los diferentes aminoácidos y los nucleótidos deben fabricarse en proporciones correctas y a un ritmo adecuado para la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, sus vías biosintéticas deben estar reguladas y coordinadas entre sí de forma precisa. Las concentraciones de aminoácidos y nucleótidos, que son moléculas cargadas, también tienen que regularse para mantener el equilibrio electroquímico de la célula. Tal como se ha comentado en capítulos anteriores, las vías metabólicas pueden estar reguladas tanto por cambios en la actividad como por la cantidad disponible de enzimas específicos. Las vías que se presentan en este capítulo proporcionan algunos de los ejemplos mejor conocidos de regulación de la actividad enzimática. El control de las *cantidades* de los diferentes enzimas en una célula (es decir, de su síntesis y degradación) se trata en el Capítulo 28.

22.1 Aspectos generales del metabolismo del nitrógeno

Las rutas biosintéticas que conducen a los aminoácidos y a los nucleótidos comparten la necesidad de nitrógeno. Por lo general, los compuestos de nitrógeno solubles y utilizables biológicamente escasean en el entorno natural. Por este motivo, la mayor parte de organismos mantienen una estricta economía en el uso del amoníaco, los aminoácidos y los nucleótidos. Veremos, en efecto, que los aminoácidos libres, las purinas y las pirimidinas, formados durante el recambio metabólico de proteínas y ácidos nucleicos, a menudo son recuperados y reutilizados. En primer lugar examinaremos las vías por las cuales se introduce el nitrógeno del medio en los sistemas biológicos.

El ciclo del nitrógeno mantiene una reserva de nitrógeno disponible biológicamente

La fuente más abundante de nitrógeno es el aire, que en sus cuatro quintas partes es nitrógeno molecular (N_2). Sin embargo, relativamente pocas especies pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas utilizables por los organismos vivos. En la biosfera, los procesos metabólicos de las diferentes especies actúan de forma interdependiente para recuperar y reutilizar el nitrógeno disponible biológicamente en un vasto **ciclo del nitrógeno (Fig. 22–1)**. El primer paso del ciclo consiste en la **fijación** (reducción) del nitrógeno atmosférico por parte de bacterias fijadoras de nitrógeno para proporcionar amoníaco (NH_3 o NH_4^+). Aunque el amoníaco puede ser utilizado por la mayor parte de organismos vivos, las bacterias del suelo, que obtienen su energía de la oxidación del amoníaco a nitrito (NO_2^-) y finalmente a nitrato (NO_3^-), son tan abundantes y activas que prácticamente todo el amoníaco que llega al suelo se oxida a nitrato. Este proceso se conoce como **nitrificación.** Las plantas y muchas bacterias pueden incorporar y reducir fácilmente nitrato y nitrito por acción de las nitrato y nitrito reductasas. El amoníaco así formado es incorporado a los aminoácidos por las plantas. Los animales a su vez utilizan las plantas como fuente de aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, para fabricar sus proteínas. Cuando los organismos mueren, la degradación microbiana de sus proteínas devuelve el amoníaco al suelo, donde bacterias nitrificantes lo convierten de nuevo en nitrito y nitrato. El equilibrio entre el nitrógeno fijado y el nitrógeno atmosférico es mantenido por las bacterias que convierten el nitrato en N_2 en condiciones anaeróbicas, proceso denominado **desnitrificación** (Fig. 22–1). Estas bacterias del suelo utilizan NO_3^- en lugar de O_2 como aceptor final de electrones en una serie de reacciones que (al igual que la fosforilación oxidativa) generan un gradiente transmembrana de protones, que se aprovecha para sintetizar ATP.

El ciclo del nitrógeno es cortocircuitado por un grupo de bacterias recientemente descubierto que llevan a cabo la oxidación anaerobia del amoníaco, o **anamox,** (Fig. 22–1), proceso que convierte amoníaco y nitrito en N_2. Puede que entre el 50% y el 70% de la conversión del NH_3 a N_2 en la biosfera ocurra mediante este proceso, no detectado hasta la década de 1980. Los anaerobios obligados que realizan la anamox son microorganismos fascinantes que pueden proporcionar soluciones eficaces para los problemas de tratamiento de residuos (Recuadro 22–1).

A continuación examinaremos el proceso de fijación del nitrógeno, el primer paso del ciclo del nitrógeno.

El nitrógeno es fijado por enzimas del complejo de la nitrogenasa

Tan sólo algunas bacterias y arqueobacterias pueden fijar el nitrógeno atmosférico. Entre ellas se encuentran las cianobacterias del suelo y de las aguas dulces y saladas, las arqueas metanogénicas (anaerobios estrictos que obtienen energía y carbono mediante la conversión de H_2 y CO_2 en metano), otros tipos de bacterias del suelo, tales como algunas especies de *Azotobacter*, y las bacterias fijadoras de nitrógeno que viven como **simbiontes** en los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas. El primer producto importante de la fijación del nitrógeno es el amoníaco, que puede ser utilizado por todos los organismos, ya sea directamente o tras su conversión en otros compuestos solubles, tales como nitritos, nitratos o aminoácidos.

La reducción del nitrógeno a amoníaco es una reacción exergónica:

$$N_2 + 3H_2 \longrightarrow 2NH_3 \qquad \Delta G'^{\circ} = -33{,}5 \text{ kJ/mol}$$

Sin embargo, el triple enlace N≡N es muy estable, con una energía de enlace de 930 kJ/mol. La fijación del nitrógeno tiene, por tanto, una energía de activación extremadamente alta que

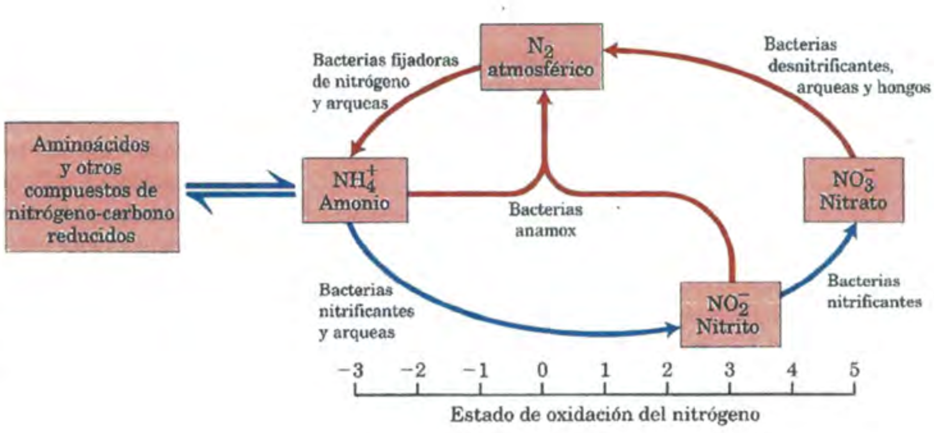


FIGURA 22–1 El ciclo del nitrógeno. La cantidad total de nitrógeno fijado anualmente en la biosfera excede los 10^{11} kg. Las reacciones indicadas con flechas rojas tienen lugar principal o enteramente en medios anaeróbicos. Los estados redox de las diversas especies nitrogenadas se indican en la parte inferior de la figura.

RECUADRO 22-1 Estilos de vida poco comunes de lo invisible pero abundante

En nuestra cualidad de aerobios, fácilmente podemos pasar por alto las bacterias y las arqueas que prosperan en medios anaeróbicos. Aunque raramente considerados en los textos de bioquímica general, estos organismos representan una gran parte de la biomasa del planeta, y su contribución al equilibrio del carbono y el nitrógeno en la biosfera es esencial para todas las formas de vida.

Tal como se ha analizado en anteriores capítulos, la energía necesaria para el mantenimiento de los sistemas vivientes depende de la generación de gradientes de protones a través de membranas. Los electrones procedentes de un sustrato reducido son transferidos sucesivamente a una serie de transportadores de electrones en las membranas hasta un aceptor final de electrones. Los protones son un producto secundario de este proceso que se acumulan a un lado de la membrana, generando un gradiente de protones a través de la membrana. Este gradiente de protones se utiliza para sintetizar ATP o para impulsar otros procesos que requieren energía. Para todos los eucariotas, el sustrato reducido es un glúcido (glucosa o piruvato) y el aceptor de electrones el oxígeno.

Muchas bacterias y arqueas son mucho más versátiles. En medios anaeróbicos, tales como los sedimentos marinos o de agua dulce, la variedad de estrategias vitales es extraordinaria. Prácticamente cualquier par redox puede ser una fuente de energía para algún organismo o grupo de organismos especializado. Por ejemplo, un gran número de bacterias litotrofas (un litotrofo es un quimiotrofo que utiliza fuentes de energía inorgánicas; véase la Fig. 1–5) poseen una hidrogenasa que utiliza hidrógeno molecular para reducir el NAD^+:

$$H_2 + NAD^+ \xrightarrow{\text{hidrogenasa}} NADH + H^+$$

El NADH es una fuente de electrones para diversos aceptores de electrones unidos a membrana y genera el gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP. Otros litotrofos oxidan compuestos de azufre (H_2S, azufre elemental o tiosulfato) o hierro ferroso. Un grupo de arqueas ampliamente distribuido, llamados metanógenas, todas estrictamente anaeróbicas, obtienen energía de la reducción del CO_2 a metano. Ésta es sólo una pequeña muestra de lo que los organismos anaeróbicos son capaces de hacer para prosperar. Las rutas metabólicas están repletas de interesantes reacciones y de cofactores altamente especializados desconocidos en nuestro mundo de aerobios obligados. El estudio de estos organismos puede procurar resultados prácticos. También puede ayudar a la compresión del origen de la vida en la Tierra primitiva, en una atmósfera carente de oxígeno molecular.

El ciclo del nitrógeno depende de una amplia variedad de bacterias especializadas. Hay dos grupos de bacterias nitrificantes: las que oxidan el amoníaco a nitritos y las que oxidan los nitritos resultantes a nitratos (véase la Fig. 22–1). Después del O_2, el nitrato es el segundo aceptor de electrones biológico más utilizado, y muchas bacterias y arqueas pueden catalizar la desnitrificación de los nitratos a nitrógeno, que a continuación las bacterias fijadoras de nitrógeno convierten de nuevo en amoníaco. El amoníaco es uno de los principales contaminantes de las aguas residuales y de los residuos de las granjas de animales, y es un producto secundario de la industria de los fertilizantes y del refinado del petróleo. Las plantas de tratamiento de residuos han utilizado comúnmente bacterias nitrificantes y desnitrificantes para convertir el amoníaco en nitrógeno atmosférico. El proceso es caro y requiere carbono orgánico y oxígeno.

En las décadas de 1960 y 1970 aparecieron algunos artículos que sugerían que el amoníaco podía oxidarse a nitrógeno anaeróbicamente, utilizando nitrito como aceptor de electrones; este proceso se denominó anamox. Estos resultados recibieron poca atención hasta que las bacterias que realizan este proceso fueron descubiertas en una instalación de tratamiento de desechos en Delft, Holanda, a mediados de la década de 1980. Un equipo de microbiólogos holandeses, liderado por Gijs Kuenen y Mike Jetten, empezó a estudiar estas bacterias, que pronto fueron identificadas como pertenecientes a un filum bacteriano poco común, los planctomicetos. Seguirían algunos sorprendentes resultados.

La bioquímica del proceso anamox fue descubriéndose poco a poco (Fig. 1). La hidracina (N_2H_4), una pequeña molécula muy reactiva, utilizada como combustible para cohetes, fue un intermediario inesperado. La hidracina es a la vez muy tóxica y difícil de almacenar. Difunde rápidamente a través de las membranas fosfolipídicas. Las bacterias anamox resuelven este problema secuestrando la hidracina en un orgánulo especializado, denominado **anamosoma.** La membrana de este orgánulo

(continúa en la página siguiente)

FIGURA 1 Las reacciones anamox. El amoníaco y el hidróxido amónico se convierten en hidracina y H_2O por la hidracina hidroxilasa y la hidracina es oxidada por el enzima oxidante de hidracina, generando N_2 y protones. Los protones generan un gradiente para la síntesis de ATP. En el exterior del anamosoma, los protones son usados por el enzima reductor de nitritos, con producción de óxido amónico y cierre del ciclo. Todos los enzimas anamox están contenidos en la membrana del anamosoma.

RECUADRO 22–1 Estilos de vida poco comunes de lo invisible pero abundante *(continuación de la página anterior)*

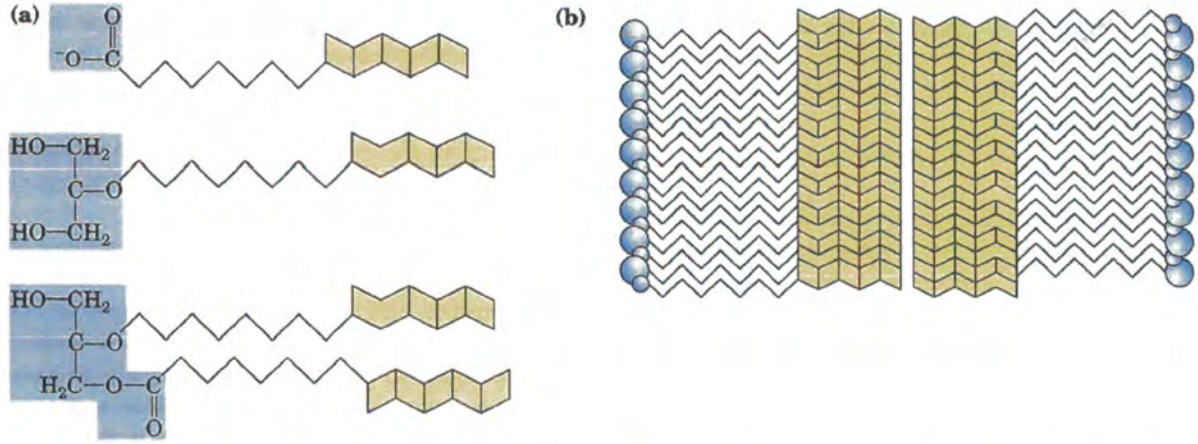


FIGURA 2 **(a)** Lípidos laderanos de la membrana del anamosoma. El mecanismo de síntesis del anillo inestable de ciclobutano es desconocido. **(b)** Los laderanos pueden apilarse para formar una estructura de membrana muy densa, impermeable e hidrofóbica, que permite el secuestro de la hidracina producida en las reacciones anamox.

está compuesta de lípidos conocidos como **laderanos** (Fig. 2), nunca antes encontrados en ningún organismo. Los anillos fundidos de ciclobutano de los laderanos forman una barrera muy densa que dificulta la liberación de hidracina. Los anillos de ciclobutano están bajo tensión y son difíciles de sintetizar; el mecanismo bacteriano para la síntesis de estos lípidos no se conoce.

El descubrimiento del anamosoma fue sorprendente. Las células bacterianas generalmente no poseen compartimientos y la falta de un núcleo limitado por una membrana se considera a menudo como la distinción fundamental entre los eucariotas y las bacterias. La presencia de orgánulos en una bacteria ya es de por sí suficientemente destacable, pero los planctomicetos también tienen núcleo: su DNA cromosómico se encuentra en el interior de una membrana (Fig. 3). El descubrimiento de esta organización subcelular ha impulsado la investigación para localizar el origen del los planctomicetos y la evolución del núcleo eucariótico. Los planctomicetos son una antigua línea bacteriana con múltiples géneros, tres de los cuales realizan las reacciones anamox. El estudio continuado de este grupo puede acercarnos al objetivo principal de la biología evolutiva: la descripción del organismo afectuosamente denominado LUCA (Last Universal Common Ancestor), el último antepasado común universal de todas las formas de vida de nuestro planeta.

Por el momento, las bacterias anamox representan un avance fundamental en el tratamiento de residuos, con una reducción en el coste de la eliminación del amoníaco de un 90% (las etapas de desnitrificación tradicionales se suprimen por completo y los costes de aireación asociados a la nitrificación son menores) y con una menor liberación de productos secundarios contaminantes. Claramente, una mayor familiaridad con las potencialidades de las bacterias puede resultar rentable a la hora de afrontar los desafíos ambientales del siglo XXI.

FIGURA 3 Micrografía electrónica de transmisión de una sección transversal de *Gemmata obscuriglobus*, que muestra el DNA en un núcleo (N) con envoltura nuclear (EN). Las bacterias del género *Gemmata* (fílum planctomicetos) no realizan reacciones anamox.

---

hace que el nitrógeno atmosférico sea prácticamente inerte en condiciones normales. El amoníaco se produce industrialmente por el procedimiento de Haber (llamado así porque su descubridor fue Fritz Haber), que requiere temperaturas entre 400 y 500 °C y presiones de nitrógeno e hidrógeno de decenas de miles de kilopascales (varios centenares de atmósferas) para conseguir la energía de activación necesaria. Sin embargo, la fijación biológica del nitrógeno ha de tener lugar a temperaturas biológicas y a 0,8 atm de nitrógeno; por tanto, la elevada barrera de activación debe superarse por otros medios. Esto se consigue, al menos en parte, por la unión y la hidrólisis del ATP. La reacción global puede escribirse así

$$N_2 + 10H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2NH_4^+ + 16ADP + 16P_i + H_2$$

La fijación biológica de nitrógeno se realiza por un complejo de proteínas muy conservado, denominado **complejo de la**

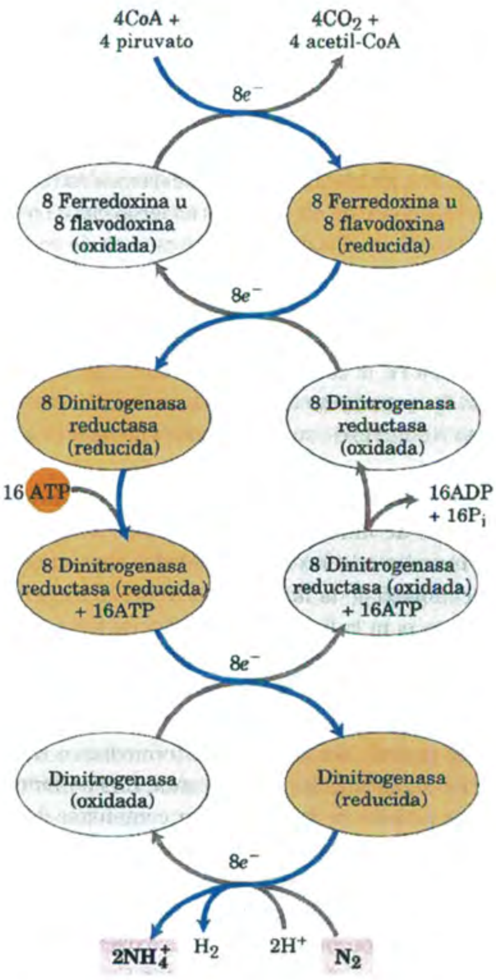


FIGURA 22–2 Fijación del nitrógeno por el complejo de la nitrogenasa. Los electrones se transfieren del piruvato a la dinitrogenasa a través de la ferredoxina (o flavodoxina) y la dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa reductasa reduce a la dinitrogenasa, que incorpora los electrones sucesivamente de uno en uno, necesitándose al menos seis electrones para fijar una molécula de N_2. Dos electrones más se utilizan para reducir 2 H^+ a H_2, en un proceso que acompaña necesariamente a la fijación del nitrógeno en los sistemas anaeróbicos, lo que significa un total de ocho electrones por molécula de N_2. Las estructuras de las subunidades y los cofactores metálicos de las proteínas dinitrogenasa reductasa y dinitrogenasa se describen en el texto y en la Figura 22–3.

nitrogenasa (Fig. 22–2). Los componentes clave de este complejo son la **dinitrogenasa reductasa** y la **dinitrogenasa (Fig. 22–3)**. La dinitrogenasa reductasa (M_r 60.000) es un dímero formado por dos subunidades idénticas. Contiene un único centro redox del tipo 4Fe-4S (véase la Fig. 19–5), unido entre las subunidades, que puede ser oxidado y reducido por un electrón. Tiene también dos sitios de unión de ATP/ADP (un sitio en cada subunidad). La dinitrogenasa (M_r 240.000) es un tetrámero formado por dos copias de dos subunidades distintas, que contiene hierro y molibdeno; sus centros redox tienen un total de 2 Mo, 32 Fe y 30 S por tetrámero. Aproximadamente la mitad del hierro y del azufre se encuentra en dos centros 4Fe-4S conectados, denominados agregados P; el resto forma parte de un cofactor de hierro-molibdeno de un nuevo tipo. Se ha descubierto una forma de nitrogenasa que contiene vanadio en lugar de molibdeno, y algunas especies de bacterias pueden producir ambos tipos de sistemas nitrogenasa. El enzima de va-

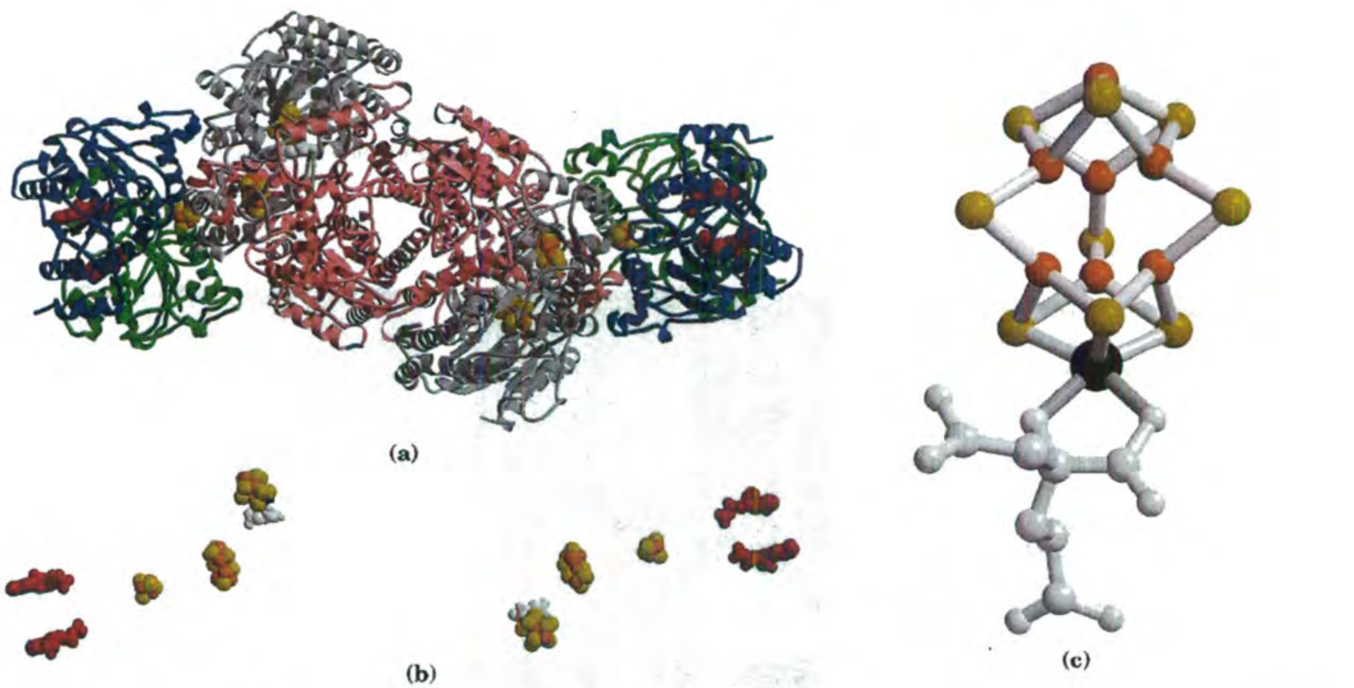


FIGURA 22–3 Enzimas y cofactores del complejo de la nitrogenasa. (PDB ID 1N2C) **(a)** En este diagrama de cinta, las subunidades de la dinitrogenasa se muestran en gris y rosa y las subunidades de la dinitrogenasa reductasa en azul y verde. El ADP unido se muestra en rojo. Observe el complejo 4Fe-4S (los átomos de Fe y S se muestran en naranja y amarillo, respectivamente) y el cofactor hierro-molibdeno (Mo negro, homocitrato gris claro). También se muestran los agregados P (pares conectados de complejos 4Fe-4S). **(b)** Los cofactores del complejo de la dinitrogenasa sin la proteína (los colores son como en **(a)**). **(c)** El cofactor hierro-molibdeno contiene 1 Mo (negro), 7 Fe (naranja), 9 S (amarillo) y una molécula de homocitrato (gris).

nadio puede ser el sistema primario de fijación de nitrógeno en algunas condiciones ambientales, pero todavía no está tan bien caracterizado como el enzima dependiente de molibdeno.

La fijación del nitrógeno se lleva a cabo por una forma altamente reducida de la dinitrogenasa y precisa ocho electrones: seis para la reducción del N_2 y dos para formar una molécula de H_2 como parte obligada del mecanismo de reacción. La dinitrogenasa se reduce por transferencia de electrones procedentes de la dinitrogenasa reductasa (Fig. 22–2). El tetrámero de la dinitrogenasa tiene dos sitios de unión para la reductasa. Los ocho electrones necesarios se transfieren a la dinitrogenasa de uno en uno: una molécula de reductasa reducida se une a la dinitrogenasa y le transfiere un único electrón y a continuación la forma oxidada de la reductasa se disocia de la dinitrogenasa en un ciclo repetitivo. Cada vuelta del ciclo precisa la hidrólisis de dos moléculas de ATP por la reductasa dimérica. La fuente inmediata de electrones para reducir la dinitrogenasa reductasa es variable, pudiéndose utilizar **ferredoxina** reducida (p. 753; véase también la Fig. 19–5), flavodoxina reducida y quizá otras fuentes. En al menos una especie, la fuente última de electrones para reducir la ferredoxina es el piruvato (Fig. 22–2).

El papel del ATP en este proceso es poco común. Recuérdese que el ATP puede proporcionar no sólo energía química a través de la hidrólisis de uno o más de sus enlaces fosfoanhídrido, sino también energía de enlace (pp. 189, 297) mediante interacciones no covalentes que reducen la energía de activación. En la reacción llevada a cabo por la dinitrogenasa reductasa tanto la unión del ATP como la hidrólisis del ATP provocan cambios de conformación de la proteína que ayudan a superar la elevada energía de activación de la fijación del nitrógeno. La unión de dos moléculas de ATP a la reductasa desplaza el potencial de reducción (E'°) de esta proteína de -300 a -420 mV, un incremento de su potencial reductor que es necesario para transferir electrones a la dinitrogenasa. Las moléculas de ATP son hidrolizadas a continuación, justo antes de la transferencia efectiva de cada electrón a la dinitrogenasa.

Otra característica importante del complejo de la nitrogenasa es su extrema labilidad en presencia de oxígeno. La reductasa se inactiva en contacto con el aire, con una vida media de 30 segundos; la dinitrogenasa tiene una vida media de 10 minutos en contacto con el aire. Las bacterias libres que fijan nitrógeno solucionan este problema mediante diferentes estrategias. Algunas viven solamente en condiciones anaeróbicas o bien reprimen la síntesis de la nitrogenasa en presencia de oxígeno. Algunas bacterias aeróbicas, como por ejemplo *Azotobacter vinelandii*, desacoplan parcialmente el transporte electrónico de la síntesis de ATP, de manera que el oxígeno es quemado tan pronto como entra en la célula (véase el Recuadro 19–1). De hecho, cuando fijan nitrógeno los cultivos de estas bacterias se calientan como resultado de sus esfuerzos para eliminar el oxígeno.

La relación simbiótica entre las plantas leguminosas y las bacterias fijadoras de nitrógeno en los nódulos de sus raíces **(Fig. 22–4)** resuelve a la vez las necesidades energéticas y la labilidad del complejo de la nitrogenasa frente al oxígeno. La energía necesaria para la fijación del nitrógeno fue probablemente la fuerza impulsora que a lo largo de la evolución condujo a esta asociación de plantas y bacterias. Las bacterias en los nódulos de las raíces tienen acceso a una gran reserva de energía en forma de abundantes glúcidos e intermediarios del ciclo del ácido cítrico suministrados por la planta. Ello permite a las bacterias de los nódulos de las raíces fijar centenares de veces más nitrógeno que sus parientes próximos que viven libres en el suelo. Para solventar el problema de la toxicidad del oxígeno, las bacterias de los nódulos de las raíces están inmersas en una disolución de una hemoproteína fijadora de oxígeno, denominada **leghemoglobina**, producida por la planta (aunque el grupo hemo puede que sea proporcionado por la bacteria). La leghemoglobina fija todo el oxígeno a su alcance, de manera que éste no puede interferir con la fijación del nitrógeno y a la vez suministra eficazmente el oxígeno al sistema de transporte de electrones de la bacteria. El beneficio para la planta, por supuesto, es un suministro rápido de nitrógeno reducido. La efi-

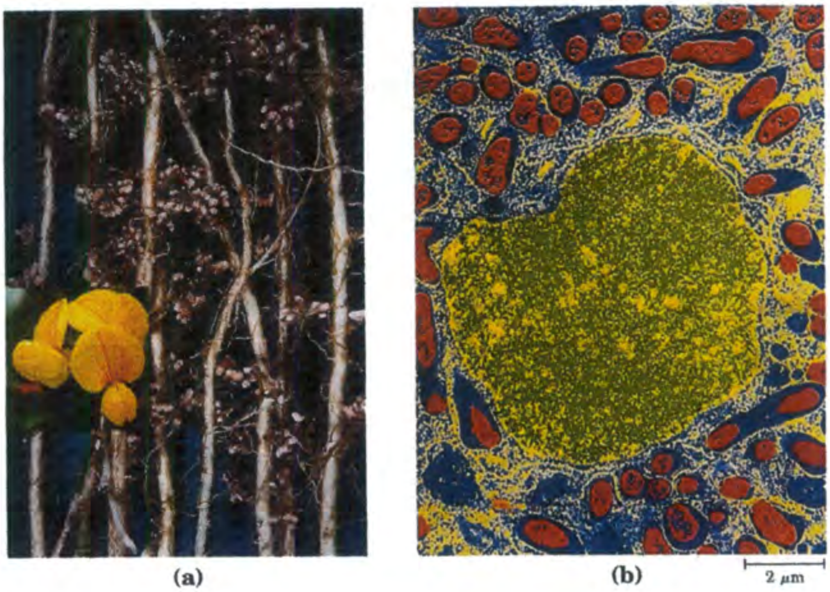


FIGURA 22–4 Nódulos fijadores de nitrógeno. **(a)** Nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces del trébol, una leguminosa. La flor de esta planta común se muestra en el recuadro. **(b)** Micrografía electrónica coloreada artificialmente de un corte delgado de un nódulo de la raíz del guisante. Bacterias simbiontes fijadoras de nitrógeno, o bacteroides (en rojo), viven en el interior de las células de los nódulos, envueltas por la membrana peribacteroide (en azul). Los bacteroides producen el complejo de la nitrogenasa, que convierte el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+); sin los bacteroides la planta es incapaz de utilizar N_2. Las células infectadas de la raíz proporcionan algunos factores esenciales para la fijación del nitrógeno, entre ellos la leghemoglobina; esta hemoproteína tiene una afinidad muy elevada por el oxígeno, que es un potente inhibidor de la nitrogenasa. (El núcleo de la célula se muestra en verde/amarillo. En esta micrografía no son visibles otros orgánulos de las células de raíz infectadas, que se hallan normalmente en las células vegetales.)

ciencia de la simbiosis entre los vegetales y las bacterias resulta evidente por el enriquecimiento en nitrógeno del suelo propiciado por las plantas leguminosas. Este enriquecimiento justifica los métodos de rotación de cultivos en los que el cultivo de plantas no leguminosas (tales como el maíz), que aprovechan el nitrógeno fijado presente en el suelo, se alterna cada pocos años con cultivos de leguminosas tales como la alfalfa, los guisantes o el trébol.

La fijación del nitrógeno es objeto de intensos estudios debido a su enorme importancia práctica. La producción industrial de amoníaco para su utilización en fertilizantes necesita mucha energía, lo que ha estimulado los esfuerzos para desarrollar organismos recombinantes o transgénicos capaces de fijar el nitrógeno. Las técnicas del DNA recombinante (Capítulo 9) están siendo utilizadas para transferir el DNA que codifica los enzimas de la fijación del nitrógeno a bacterias no fijadoras de nitrógeno y a plantas. El éxito de estos esfuerzos depende de la solución del problema de la toxicidad del oxígeno en cualquier célula que produzca nitrogenasa.

El amoníaco se incorpora a las biomoléculas a través del glutamato y la glutamina

El nitrógeno reducido en forma NH_4^+ es incorporado primero en los aminoácidos y posteriormente en otras biomoléculas que contienen nitrógeno. Dos aminoácidos, **glutamato** y **glutamina,** constituyen el punto crítico de entrada. Recuerde que estos dos mismos aminoácidos tienen un papel central en el catabolismo del amoníaco y de los grupos amino en la oxidación de los aminoácidos (Capítulo 18). El glutamato es la fuente de grupos amino de la mayor parte de los aminoácidos restantes, a través de reacciones de transaminación (la reacción inversa de la que se muestra en la Fig. 18–4). El nitrógeno del grupo amida de la glutamina es una fuente de grupos amino para una amplia gama de procesos biosintéticos. En la mayoría de tipos celulares, y de fluidos extracelulares en los organismos superiores, uno o ambos aminoácidos están presentes en concentraciones más elevadas, a veces un orden de magnitud o más, que los otros aminoácidos. Una célula de *Escherichia coli* necesita tal cantidad de glutamato que este aminoácido resulta ser uno de los principales solutos del citosol. Su concentración está regulada, no sólo en respuesta a las necesidades de nitrógeno por parte de la célula, sino también para mantener el equilibrio osmótico entre el citosol y el medio externo.

Las rutas biosintéticas que conducen al glutamato y a la glutamina son sencillas y todos o algunos de sus pasos se encuentran en la mayoría de organismos. La vía más importante para la incorporación del NH_4^+ en el glutamato requiere dos reacciones. Primero, la **glutamina sintetasa** cataliza la reacción del glutamato y el NH_4^+ para dar glutamina. Esta reacción tiene lugar en dos pasos, con el γ-glutamil fosfato unido al enzima como intermediario (véase la Fig. 18–8):

(1) Glutamato + ATP ⟶ γ-glutamil fosfato + ADP

(2) γ-Glutamil fosfato + NH_4^+ ⟶ glutamina + P_i + H^+

Suma: Glutamato + NH_4^+ + ATP ⟶ glutamina + ADP + P_i + H^+ (22–1)

La glutamina sintetasa se encuentra en todos los organismos. Además de su importancia para la asimilación del NH_4^+ en las bacterias, esta reacción tiene un papel central en el metabolismo de los aminoácidos en los mamíferos, al convertir el NH_4^+ libre, que es tóxico, en glutamina para su transporte en la sangre (Capítulo 18).

En las bacterias y en las plantas, el glutamato se produce a partir de la glutamina en una reacción catalizada por la **glutamato sintasa.** El α-cetoglutarato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, experimenta una aminación reductora, utilizando glutamina como dador de nitrógeno:

α-Cetoglutarato + glutamina + NADPH + H⁺ ⟶ 2 glutamato + NADP⁺   (22–2)

La reacción global de la glutamina sintetasa y de la glutamato sintasa (Ecs. 22–1 y 22–2) es:

α-Cetoglutarato + NH_4^+ + NADPH + ATP ⟶ L-glutamato + NADP⁺ + ADP + P_i

Los animales carecen de glutamato sintasa; no obstante, el glutamato se mantiene a niveles elevados por procesos tales como la transaminación del α-cetoglutarato durante el catabolismo de los aminoácidos.

El glutamato también se puede formar, aunque en menor proporción, por otra vía: la reacción del α-cetoglutarato y el NH_4^+ para formar glutamato en un solo paso. Está catalizada por la L-glutamato deshidrogenasa, un enzima presente en todos los organismos. El poder reductor lo proporciona el NADPH:

α-Cetoglutarato + NH_4^+ + NADPH ⟶ L-glutamato + NADP⁺ + H_2O

Vimos esta reacción en el catabolismo de los aminoácidos (véase la Fig. 18–7). En las células eucarióticas, la L-glutamato deshidrogenasa se localiza en la matriz mitocondrial. El equilibrio de la reacción favorece a los reactivos, y la K_m para el NH_4^+ (~1 mM) es tan alta que probablemente la contribución de la reacción a la asimilación del NH_4^+ en los aminoácidos y otros metabolitos es muy pequeña. (Recuerde que la reacción de la glutamato deshidrogenasa, en sentido contrario (véase la Fig. 18–10), es una fuente de NH_4^+ para el ciclo de la urea.) Unas concentraciones de NH_4^+ suficientemente elevadas para que la reacción de la glutamato deshidrogenasa contribuya de manera significativa a los niveles de glutamato se obtienen solamente cuando se añade NH_3 al suelo o cuando los microorganismos crecen en el laboratorio en presencia de concentraciones elevadas de NH_3. En general, las bacterias del suelo y las plantas utilizan la vía de los dos enzimas, descrita anteriormente (Ecs. 22–1, 22–2).

La glutamina sintetasa es un punto de regulación principal del metabolismo del nitrógeno

La actividad de la glutamina sintetasa está regulada en prácticamente todos los organismos, lo que no es sorprendente si consideramos su papel metabólico central como punto de entrada del nitrógeno reducido. En las bacterias entéricas tales como *Escherichia coli*, la regulación es sumamente compleja. El enzima está formado por 12 subunidades idénticas de M_r 50.000

(Fig. 22–5) y está regulado alostéricamente y por modificación covalente al mismo tiempo. La alanina, la glicina y al menos seis productos finales del metabolismo de la glutamina son inhibidores alostéricos del enzima **(Fig. 22–6)**. Cada inhibidor por sí solo causa solamente una inhibición parcial. Los efectos de los distintos inhibidores son más que aditivos, de manera que actuando conjuntamente llegan a inactivar totalmente el enzima. Este mecanismo de control proporciona un ajuste continuo de los niveles de glutamina en respuesta a los requerimientos metabólicos.

A la regulación alostérica se superpone la inhibición por adenililación (incorporación de AMP) de la Tyr^{397}, localizada cerca del centro activo del enzima **(Fig. 22–7)**. Esta modificación covalente incrementa la sensibilidad del enzima a los

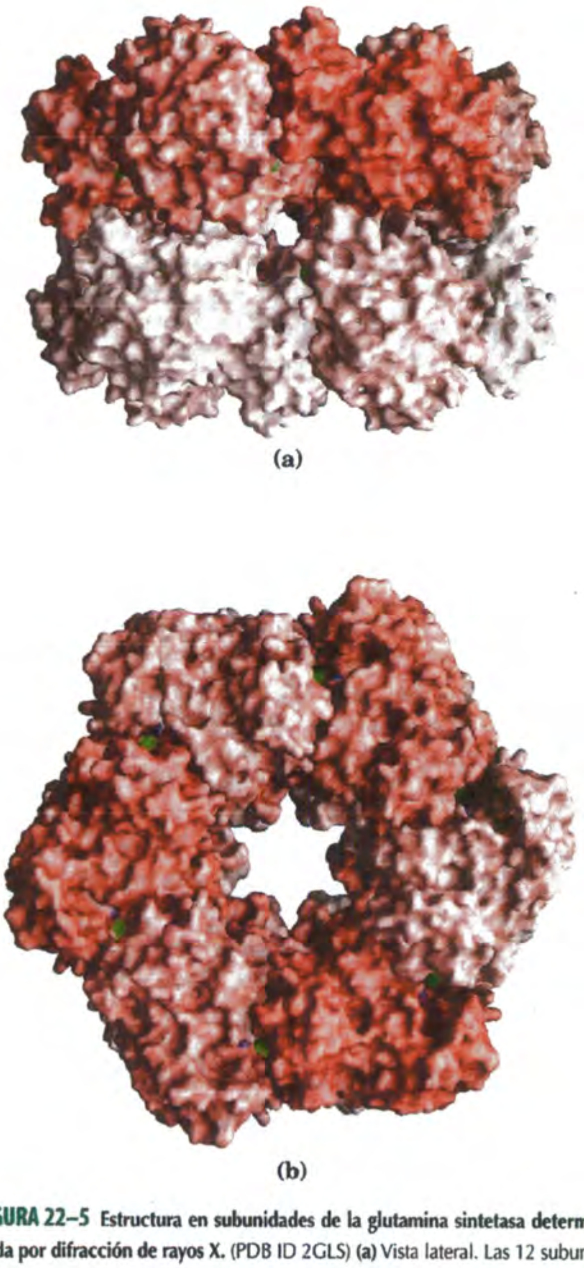


FIGURA 22–5 Estructura en subunidades de la glutamina sintetasa determinada por difracción de rayos X. (PDB ID 2GLS) **(a)** Vista lateral. Las 12 subunidades son idénticas; están coloreadas de manera diferente para ilustrar el empaquetamiento y la localización. **(b)** Vista superior. Muestra los centros activos (verde).

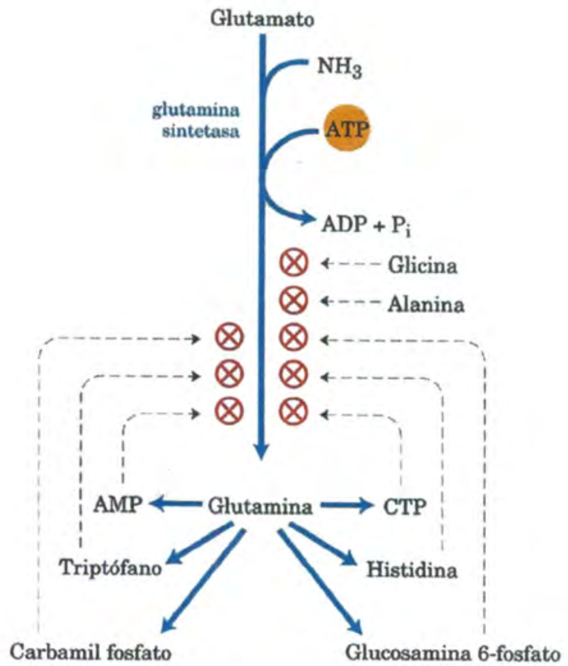


FIGURA 22–6 Regulación alostérica de la glutamina sintetasa. El enzima está regulado de forma acumulativa por seis productos finales del metabolismo de la glutamina. La alanina y la glicina probablemente actúan de indicadores del estado general del metabolismo de los aminoácidos en la célula.

inhibidores alostéricos, y la actividad disminuye cuantas más subunidades son adenililadas. Tanto la adenililación como la desadenililación son promovidas por la **adenililtransferasa** (AT en la Fig. 22–7), que forma parte de una compleja cascada enzimática que responde a los niveles de glutamina, α-cetoglutarato, ATP y P_i. La actividad de la adenililtransferasa está modulada por la unión a una proteína reguladora denominada P_{II}, y la actividad de P_{II} es a su vez regulada por modificación covalente (uridililación) de nuevo en un residuo de Tyr. El complejo adenililtransferasa con P_{II} uridililada (P_{II}-UMP) estimula la desadenililación, mientras que el mismo complejo con P_{II} desuridililada estimula la adenililación de la glutamina sintetasa. Tanto la uridililación como la desuridililación de P_{II} se llevan a cabo por un único enzima, la **uridililtransferasa.** La uridililación es inhibida por unión de glutamina y P_i a la uridililtransferasa y es estimulada por unión de α-cetoglutarato y ATP a P_{II}.

La regulación no se detiene aquí: la P_{II} uridililada también facilita la activación de la transcripción del gen que codifica la glutamina sintetasa, con lo que se aumenta la concentración celular del enzima; la P_{II} desuridililada provoca un descenso en la transcripción del mismo gen. En este mecanismo interviene la interacción de P_{II} con otras proteínas implicadas en la regulación génica, de un tipo descrito en el Capítulo 28. El resultado neto de este complejo sistema de controles es una disminución de la actividad glutamina sintetasa cuando los niveles de glutamina son altos y un incremento de la actividad cuando los niveles de glutamina son bajos y el α-cetoglutarato y el ATP (sustratos de la reacción de la sintetasa) están disponibles. Los múltiples niveles de regulación permiten una respuesta sensi-

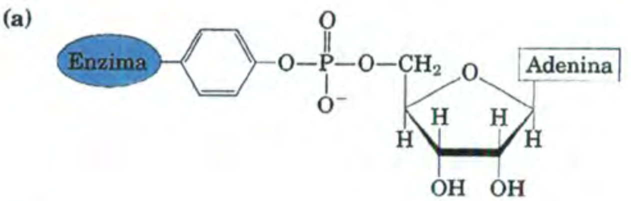
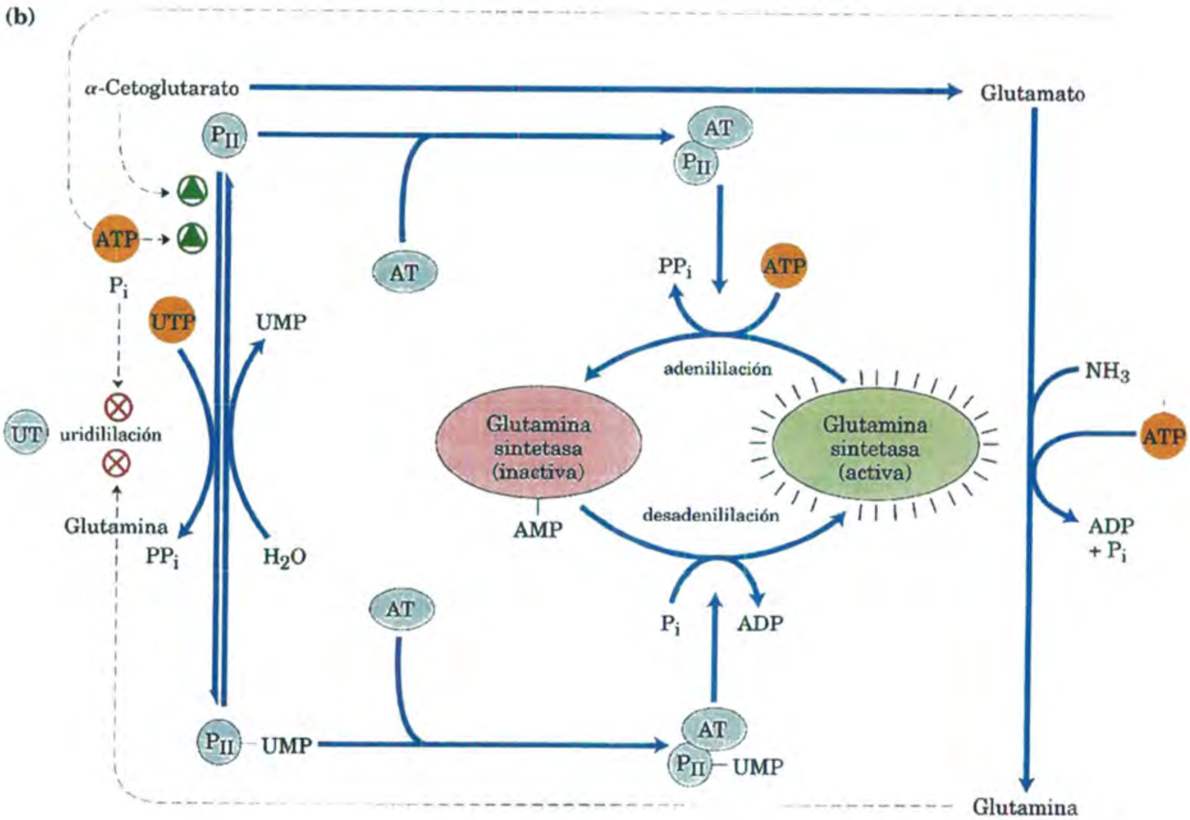


FIGURA 22–7 Segundo nivel de regulación de la glutamina sintetasa: modificaciones covalentes. (a) Un residuo Tyr adenililado. **(b)** Cascada que conduce a la adenililación (inactivación) de la glutamina sintetasa. AT representa la adenilil transferasa; UT, la uridilil transferasa. Los detalles de esta cascada se comentan en el texto.



ble en la que la síntesis de glutamina se ajusta a las necesidades celulares.

Varios tipos de reacciones tienen papeles específicos en la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos

Las vías que se describen en este capítulo contienen una amplia variedad de reordenamientos químicos interesantes. Algunos de ellos se repiten y merecen un comentario especial antes de describir las propias rutas metabólicas. Estos son (1) las reacciones de transaminación y otros reordenamientos propiciados por enzimas que utilizan piridoxal fosfato; (2) la transferencia de grupos monocarbonados, con tetrahidrofolato (normalmente en los niveles de oxidación de —CHO y —CH_2OH) o *S*-adenosilmetionina (al nivel de oxidación —CH_3) como cofactores, y (3) la transferencia de grupos amino procedentes del nitrógeno del grupo amida de la glutamina. El piridoxal fosfato (PLP), el tetrahidrofolato (H_4 folato) y la *S*-adenosilmetionina (adoMet) ya han sido descritos en detalle en el Capítulo 18 (véanse las Figs. 18–6, 18–17 y 18–18). En este capítulo nos centraremos en la transferencia de grupos amino a partir del grupo amida de la glutamina.

Existen más de una docena de reacciones biosintéticas conocidas en las que la glutamina es la principal fuente fisiológica de grupos amino. La mayor parte de estas reacciones se encuentran en las rutas metabólicas tratadas en este capítulo. La clase de enzimas que catalizan estas reacciones se denominan **glutamina amidotransferasas.** Todas ellas tienen dos dominios estructurales, uno que fija la glutamina y otro que fija el segundo sustrato, que actúa de aceptor del grupo amino **(Fig. 22–8)**. Se cree que un residuo conservado de Cys en el dominio de unión de la glutamina actúa como nucleófilo, rompiendo el enlace amida de la glutamina y formando un intermediario de glutamilo unido covalentemente al enzima. El NH_3 que se produce en esta reacción no se libera, sino que se transfiere a través de un "canal de amoníaco" hasta un segundo sitio activo donde reacciona con el segundo sustrato para formar el producto aminado. El intermediario covalente se hidroliza para dar enzima libre y glutamato. Si el segundo sustrato debe ser activado, generalmente se utiliza ATP para formar un intermediario acil fosfato (R—OX en la Fig. 22–8, donde X es un grupo fosforilo). La glutaminasa actúa de forma similar, pero utiliza H_2O como segundo sustrato, de manera que produce NH_4^+ y glutamato (véase la Fig. 18–8).

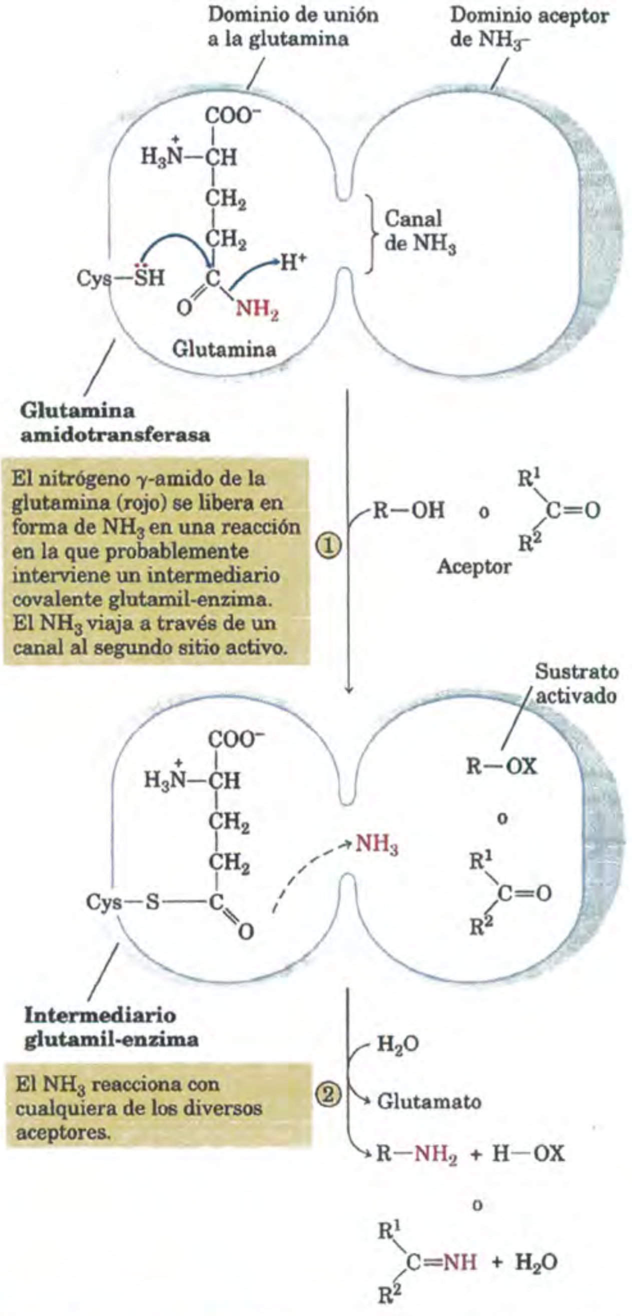


FIGURA DE MECANISMO 22–8 Mecanismo propuesto para las glutamina amidotransferasas. Cada enzima tiene dos dominios. El dominio de unión a la glutamina tiene una serie de elementos estructurales que se han conservado en muchos de estos enzimas, entre los que se encuentra un residuo Cys necesario para la actividad. El dominio del aceptor de NH_3 (segundo sustrato) es variable. Se muestran dos tipos de aceptores de grupos amino. X representa un grupo activador, normalmente un grupo fosforilo derivado del ATP, que facilita el desplazamiento de un grupo hidroxilo del R—OH por NH_3.

RESUMEN 22.1 Aspectos generales del metabolismo del nitrógeno

- El nitrógeno molecular que constituye hasta el 80% de la atmósfera terrestre no es accesible a la mayoría de organismos hasta que se encuentra en forma reducida. Esta fijación del N_2 atmosférico tiene lugar en ciertas bacterias que viven autónomamente y en bacterias simbióticas en los nódulos de las raíces de las leguminosas.
- El ciclo del nitrógeno conduce a la formación de amoníaco por fijación bacteriana del N_2, nitrificación del amoníaco a nitrato por organismos del suelo, conversión del nitrato en amoníaco por las plantas superiores, síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco por todos los organismos y conversión del nitrato en N_2 por las bacterias desnitrificantes del suelo. Las bacterias anamox oxidan anaeróbicamente el amoníaco a nitrógeno, utilizando el nitrito como aceptor de electrones.
- El complejo de la nitrogenasa lleva a cabo la fijación del N_2 en forma de NH_3, en una reacción que requiere ATP. El complejo de la nitrogenasa es muy lábil en presencia de O_2.
- En los sistemas vivos, el nitrógeno reducido se incorpora primeramente a los aminoácidos y seguidamente a muchas otras biomoléculas, incluidas los nucleótidos. El punto de entrada clave es el aminoácido glutamato. El glutamato y la glutamina son los dadores de nitrógeno en una gran variedad de reacciones biosintéticas. La glutamina sintetasa, que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato, es un importante enzima regulador del metabolismo del nitrógeno.
- Las rutas biosintéticas de los aminoácidos y nucleótidos utilizan repetidamente los cofactores biológicos piridoxal fosfato, tetrahidrofolato y *S*-adenosilmetionina. El piridoxal fosfato es necesario para las reacciones de transaminación en las que interviene el glutamato y para otras transformaciones de los aminoácidos. Las transferencias de un carbono requieren *S*-adenosilmetionina y tetrahidrofolato. Las glutamina amidotransferasas catalizan reacciones que incorporan nitrógeno procedente de la glutamina.

22.2 Biosíntesis de los aminoácidos

Todos los aminoácidos proceden de intermediarios de la glucólisis, del ciclo del ácido cítrico o de la ruta de las pentosas fosfato **(Fig. 22–9)**. El nitrógeno entra en estas vías a través del glutamato y la glutamina. Algunas rutas son sencillas, otras complejas. La síntesis de diez de los aminoácidos precisa tan sólo de uno o de pocos pasos desde el metabolito común del que proceden. Las vías biosintéticas de otros aminoácidos, tales como los aminoácidos aromáticos, son más complejas.

Los distintos organismos presentan considerables diferencias en su capacidad para sintetizar los 20 aminoácidos estándar. Mientras que la mayor parte de bacterias y plantas pueden sintetizar los 20 aminoácidos, los mamíferos sólo pueden sintetizar la mitad, generalmente aquellos cuyas vías metabólicas son sencillas. Estos son los denominados **aminoácidos no esenciales,** que no son necesarios en la dieta (véase la Tabla 18–1). El resto, los **aminoácidos esenciales,** deben obtenerse de los alimentos. A menos que se indique lo contrario, las vías para los 20 aminoácidos estándar que se presentan a continuación pertenecen a las bacterias.

Un procedimiento que resulta útil para ordenar estas vías biosintéticas consiste en agruparlos en seis familias, según sus

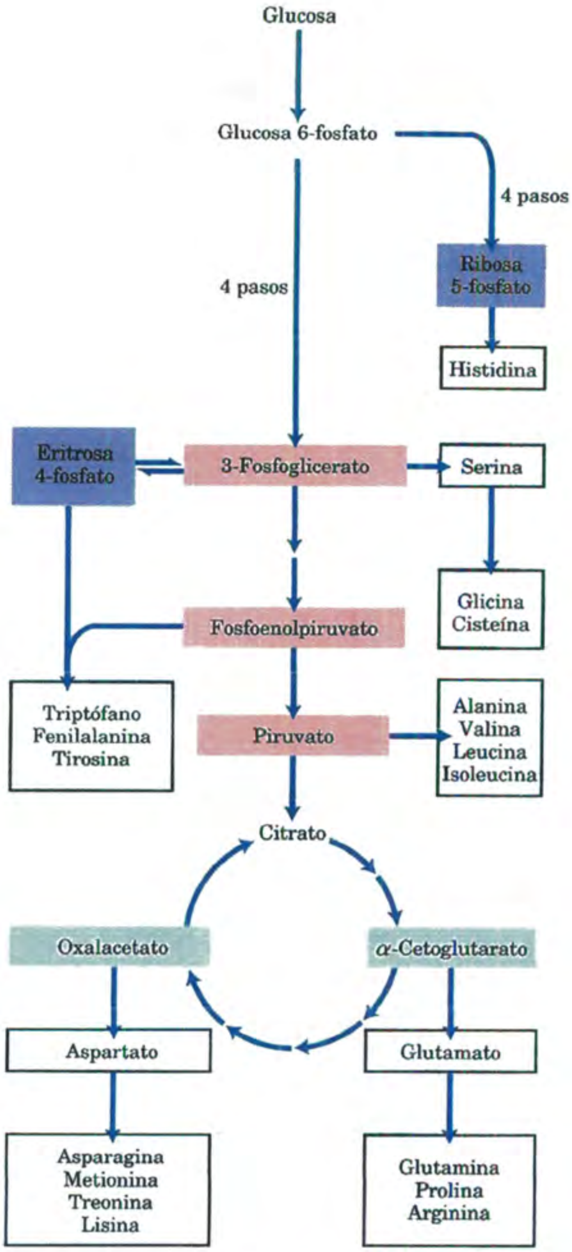


FIGURA 22–9 Esquema general de la biosíntesis de los aminoácidos. Los esqueletos carbonados de los precursores proceden de tres fuentes: glucólisis (en rosa), ciclo del ácido cítrico (en azul) y ruta de las pentosas fosfato (en violeta).

precursores metabólicos (Tabla 22–1). Hemos aplicado este criterio para organizar las descripciones detalladas que se presentan a continuación. Además de estos seis precursores hay un compuesto intermediario notable que aparece en varias vías de síntesis de aminoácidos y nucleótidos: el **5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP):**

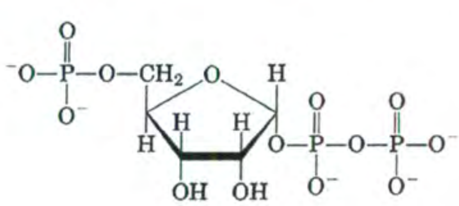


TABLA 22–1 Familias biosintéticas de aminoácidos según sus precursores metabólicos

α-Cetoglutarato	**Piruvato**
Glutamato	Alanina
Glutamina	Valina*
Prolina	Leucina*
Arginina	Isoleucina*
3-Fosfoglicerato	**Fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato**
Serina	Triptófano*
Glicina	Fenilalanina*
Cisteína	Tirosina†
Oxalacetato	**Ribosa 5-fosfato**
Aspartato	Histidina*
Asparagina	
Metionina*	
Treonina*	
Lisina*	

*Aminoácidos esenciales.
†Derivado de la fenilalanina en los mamíferos.

El PRPP se sintetiza a partir de la ribosa-5-fosfato, procedente de la ruta de las pentosas fosfato (véase la Fig. 14–21), en una reacción catalizada por la **ribosa fosfato pirofosfoquinasa:**

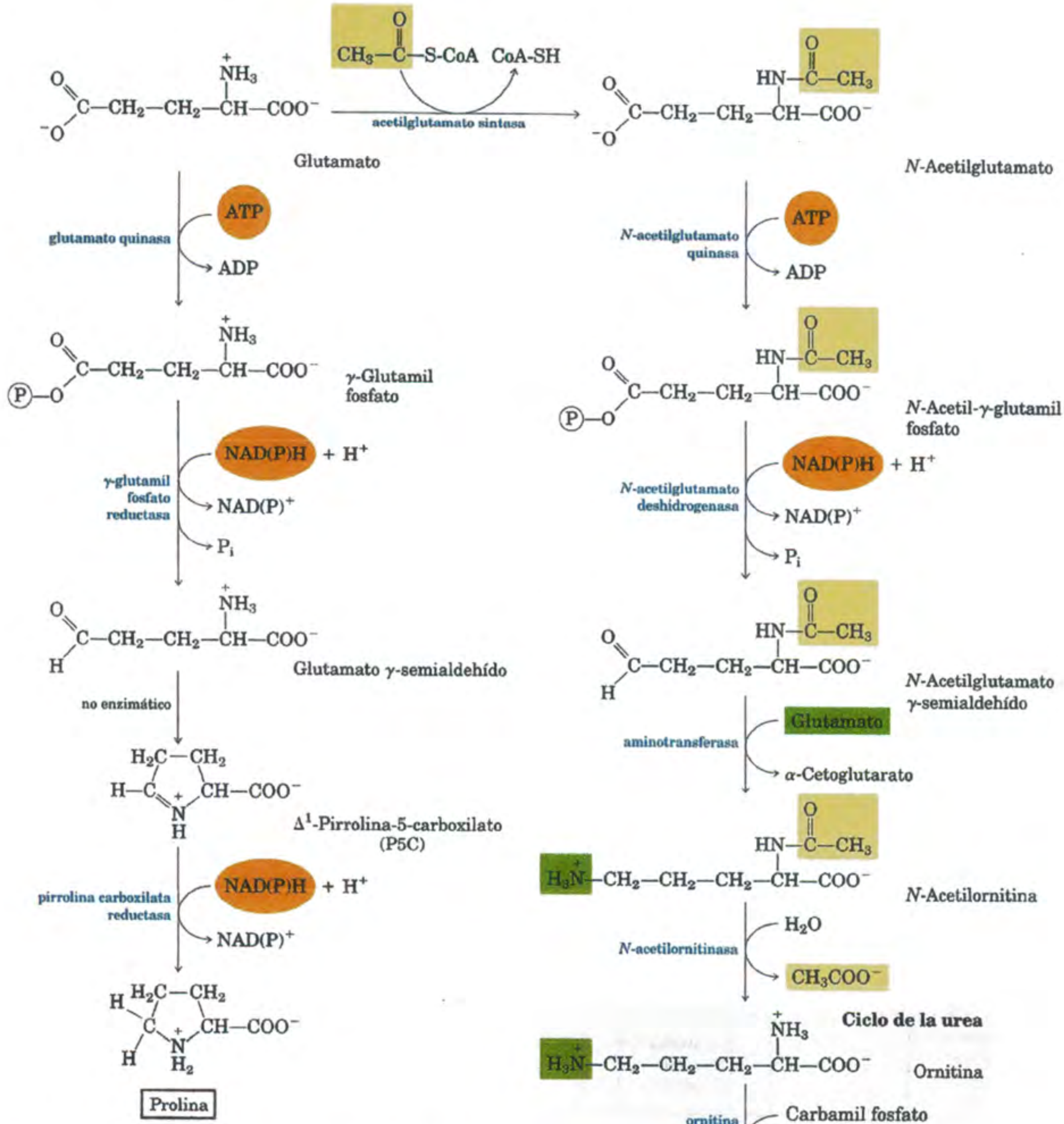
$$\text{Ribosa 5-fosfato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{5-fosforribosil-1-pirofosfato} + \text{AMP}$$

Este enzima está regulado alostéricamente por muchas de las biomoléculas que se forman a partir del PRPP.

El α-cetoglutarato es precursor del glutamato, la glutamina, la prolina y la arginina

Ya hemos descrito anteriormente la biosíntesis del **glutamato** y la **glutamina.** La **prolina** es un derivado cíclico del glutamato **(Fig. 22–10)**. En el primer paso de la síntesis de la prolina, el ATP reacciona con el grupo γ-carboxilo del glutamato para formar un acil fosfato, que es reducido por el NADPH o el NADH a glutamato γ-semialdehído. Este intermediario se cicla rápida y espontáneamente y a continuación se vuelve a reducir para dar prolina.

La **arginina** se sintetiza a partir del glutamato a través de la ornitina y el ciclo de la urea en los animales (Capítulo 18). En principio, la ornitina también podría sintetizarse a partir del glutamato γ-semialdehído por transaminación, pero la ciclación espontánea del semialdehído en la vía de la prolina impide un suministro suficiente de este intermediario para la síntesis de



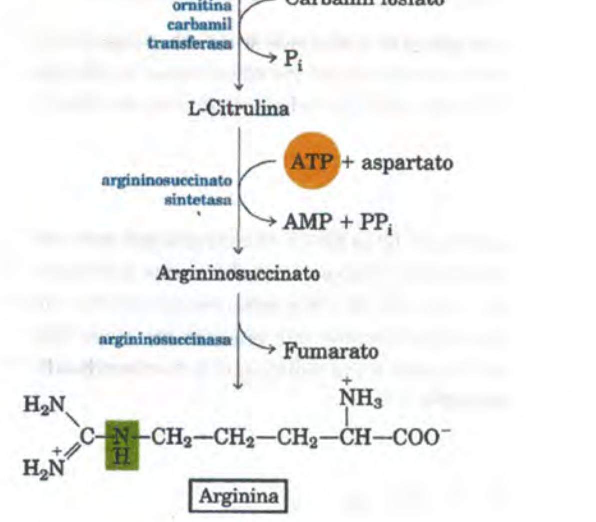


FIGURA 22–10 Biosíntesis de prolina y arginina a partir de glutamato en las bacterias. Los cinco átomos de carbono de la prolina proceden del glutamato. En muchos organismos, la glutamato deshidrogenasa es peculiar ya que puede utilizar *tanto* NADH *como* NADPH como cofactor. Lo mismo puede suceder con otros enzimas de la ruta. El γ-semialdehído en la vía de la prolina sufre una ciclación rápida y reversible a Δ^1-pirrolina-5-carboxilato (P5C), con la formación de P5C favorecida en el equilibrio. La acetilación del grupo α-amino del glutamato en el primer paso y la eliminación del grupo acetilo tras la transaminación impide la ciclación en la vía de la ornitina/arginina. Aunque algunas bacterias carecen de arginasa, y por lo tanto del ciclo de la urea completo, pueden sintetizar arginina a partir de ornitina en una serie de pasos paralelos a los del ciclo de la urea de los mamíferos, con citrulina y argininosuccinato como intermediarios (véase la Fig. 18–10).

Aquí, y en figuras posteriores de este capítulo, las flechas de reacción indican la ruta lineal hacia los productos finales, sin considerar la reversibilidad de los diferentes pasos individuales. Por ejemplo, el segundo paso de la ruta que lleva a la arginina, catalizado por la *N*-acetilglutamato deshidrogenasa, es químicamente similar a la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de la glucólisis (véase la Fig. 14–7), siendo fácilmente reversible.

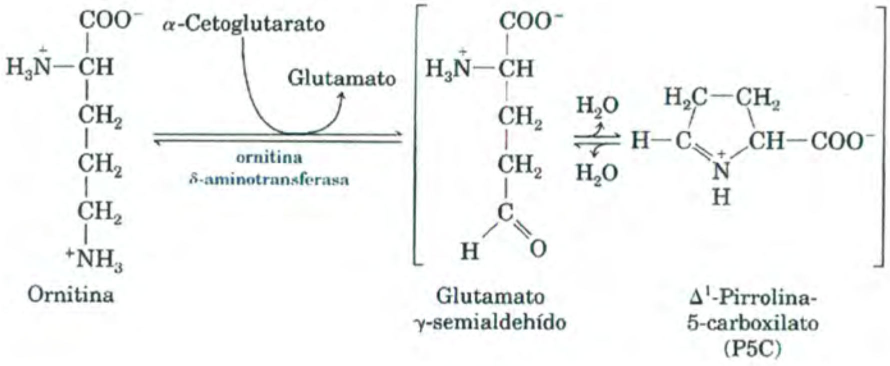


FIGURA 22–11 Reacción de la ornitina δ-aminotransferasa: un paso de la ruta de la prolina en los mamíferos. Este enzima se encuentra en la matriz mitocondrial de la mayoría de tejidos. Aunque el equilibrio favorece la formación de P5C, en los mamíferos la reacción inversa es la única vía para la síntesis de ornitina (y por tanto de arginina) cuando los niveles de arginina son insuficientes para la síntesis de proteínas.

ornitina. Las bacterias poseen una vía para la biosíntesis de novo de la ornitina (y por tanto de la arginina) que incorpora algunos pasos de la vía de la prolina, pero que incluye dos pasos adicionales que evitan el problema de la ciclación espontánea del glutamato γ-semialdehído (Fig. 22–10). En el primer paso, el grupo α-amino del glutamato se bloquea al inicio de la vía por una reacción de acetilación, que requiere acetil-CoA; a continuación, después de la transaminación, se elimina el grupo acetilo para dar ornitina.

Las vías de la prolina y de la arginina presentan algunas diferencias en los mamíferos. La prolina puede ser sintetizada por la vía mostrada en la Figura 22–10, pero también se forma a partir de la arginina obtenida de la dieta o de la proteína tisular. La arginasa, un enzima del ciclo de la urea, convierte la arginina en ornitina y urea (véanse las Figs. 18–10 y 18–26). La ornitina se convierte en glutamato γ-semialdehído por el enzima **ornitina δ-aminotransferasa (Fig. 22–11)**. El semialdehído se cicla para formar Δ¹-pirrolina-5-carboxilato, que se convierte en prolina (Fig. 22–10). Los mamíferos no poseen la vía para la síntesis de arginina mostrada en la Figura 22–10. Cuando la arginina procedente de la dieta o del recambio proteico es insuficiente para la síntesis de proteínas, la reacción de la ornitina δ-aminotransferasa opera en la dirección de la formación de ornitina. La ornitina se convierte entonces en citrulina y arginina en el ciclo de la urea.

La serina, la glicina y la cisteína proceden del 3-fosfoglicerato

La principal vía metabólica para la formación de **serina** es la misma en todos los organismos **(Fig. 22–12)**. En el primer paso, el grupo hidroxilo del 3-fosfoglicerato se oxida por una deshidrogenasa (que utiliza NAD^+) para dar 3-fosfohidroxipiruvato. Por transaminación a partir de glutamato se forma 3-fosfoserina, que se hidroliza por acción de la fosfoserina fosfatasa para dar serina libre.

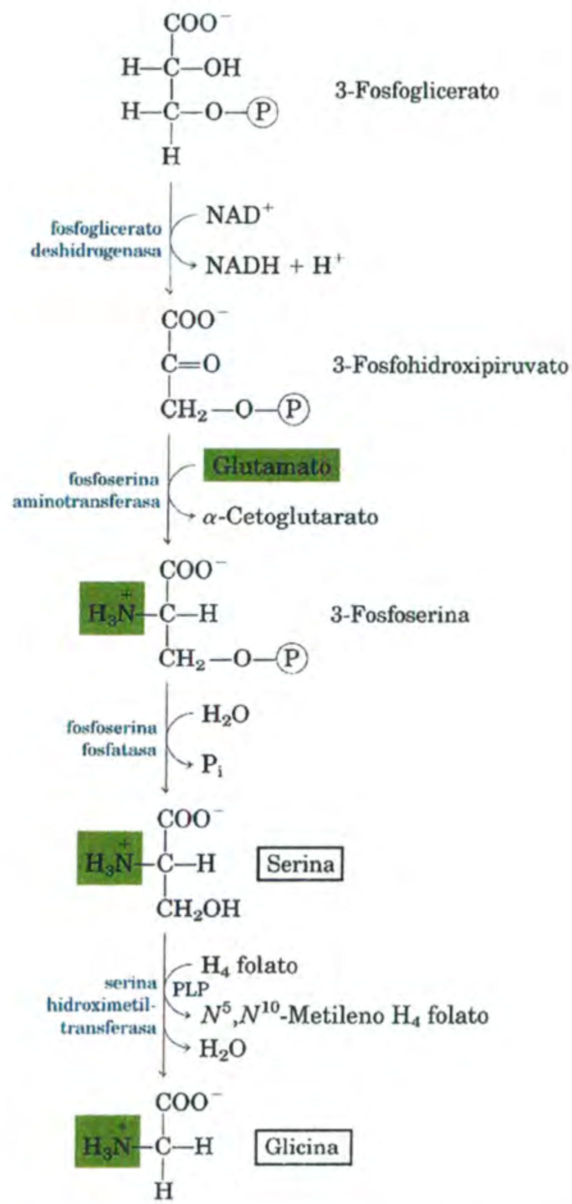


FIGURA 22–12 Biosíntesis de serina a partir de 3-fosfoglicerato y de glicina a partir de serina en todos los organismos. La glicina también puede formarse a partir de CO_2 y NH_4^+ por acción de la glicina sintasa, con N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato como dador del grupo metilo (véase el texto).

La serina (tres carbonos) es el precursor de la **glicina** (dos carbonos) por eliminación de un átomo de carbono por la acción del enzima **serina hidroximetiltransferasa** (Fig. 22–12). El tetrahidrofolato es el aceptor del carbono β (C-3) de la serina, que forma un puente metileno entre el N-5 y el N-10 para dar N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato (véase la Fig. 18–17). La reacción global, que es reversible, también requiere la presencia de piridoxal fosfato.

En el hígado de los vertebrados la glicina puede sintetizarse también por otra vía: la reacción inversa de la que se muestra en la Fig. 18–20c, catalizada por la **glicina sintasa,** también denominada **enzima de rotura de la glicina.**

$$\mathrm{CO_2 + NH_4^+ + \mathit{N}^5,\mathit{N}^{10}\text{-metilenotetrahidrofolato} + NADH + H^+ \longrightarrow glicina + tetrahidrofolato + NAD^+}$$

Las plantas y las bacterias producen el azufre reducido necesario para la síntesis de **cisteína** (y de metionina, descrita más adelante) de los sulfatos del medio; la vía se muestra en el lado derecho de la **Figura 22–13**. El sulfato se activa en dos etapas para formar 3′-fosfoadenosina 5′-fosfosulfato (PAPS), que se reduce a sulfuro con ocho electrones. El sulfuro se utiliza a continuación en la formación de cisteína a partir de la serina en una vía de dos pasos.

En los mamíferos la cisteína se fabrica a partir de dos aminoácidos: la metionina proporciona el átomo de azufre y la serina proporciona el esqueleto carbonado. La metionina se convierte primero en *S*-adenosilmetionina (véase la Fig. 18–18), que puede ceder el grupo metilo a cualquiera de entre varios aceptores, para dar *S*-adenosilhomocisteína (adoHcy). Este producto desmetilado se hidroliza para dar homocisteína libre, que reacciona con la serina en una reacción catalizada por la **cistationina β-sintasa** para dar cistationina **(Fig. 22–14)**. Por último, la **cistationina γ-liasa,** un enzima que precisa PLP, cataliza la eliminación de amoníaco y la ruptura de la cistationina para dar cisteína libre.

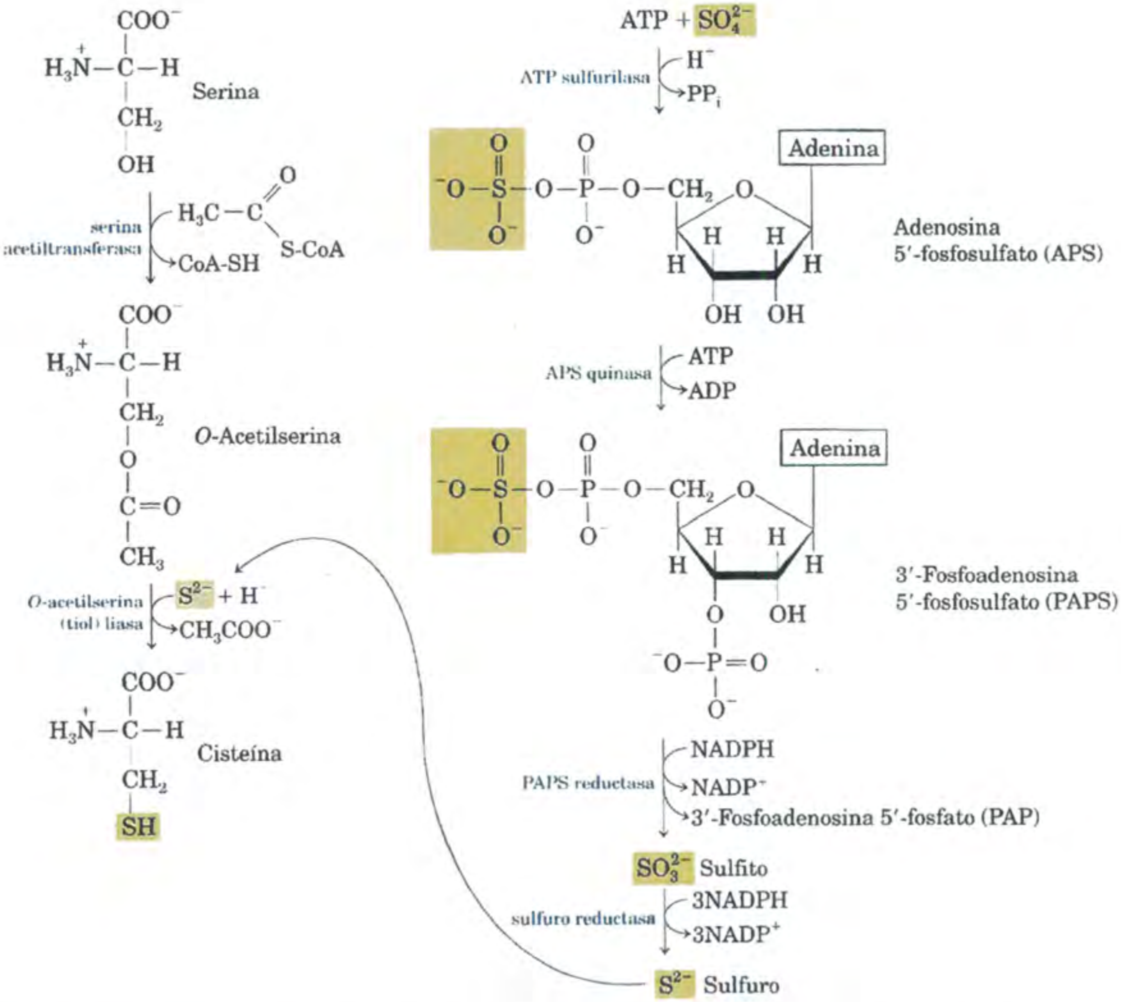


FIGURA 22–13 Biosíntesis de la cisteína a partir de serina en bacterias y plantas. El origen del azufre reducido se muestra a la derecha.

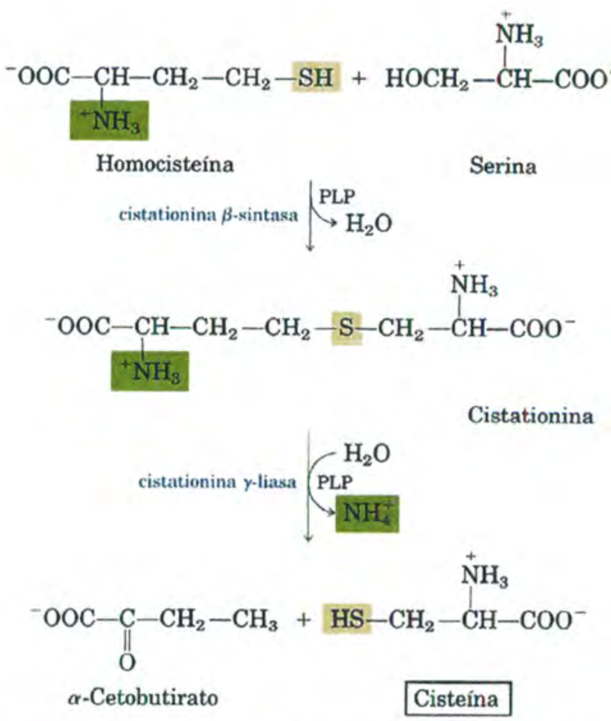
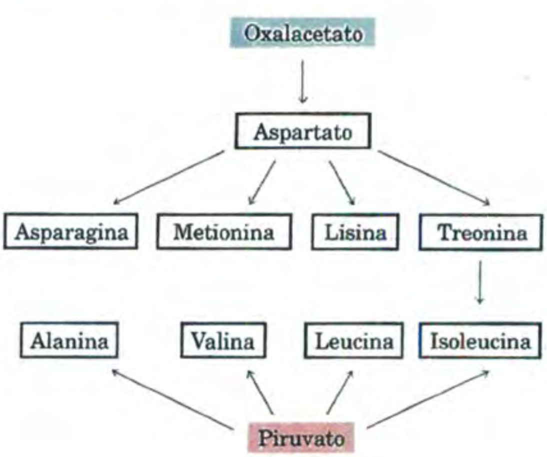


FIGURA 22–14 Biosíntesis de cisteína a partir de homocisteína y serina en mamíferos. La homocisteína se forma a partir de metionina tal como se describe en el texto.

Tres aminoácidos no esenciales y seis aminoácidos esenciales se sintetizan a partir de oxalacetato y piruvato



La **alanina** y el **aspartato** se sintetizan a partir de piruvato y de oxalacetato, respectivamente, por transaminación con el glutamato. La **asparagina** se sintetiza por amidación del aspartato, utilizando la glutamina como dador de NH_4^+. Estos aminoácidos no son esenciales y sus sencillos mecanismos de biosíntesis se encuentran en todos los organismos.

Por razones sólo en parte conocidas, los linfocitos malignos presentes en la leucemia linfoblástica aguda infantil (ALL) requieren asparagina sérica para su crecimiento. La quimioterapia para la ALL se administra junto con una L-asparaginasa de origen bacteriano con objeto de reducir la asparagina sérica.

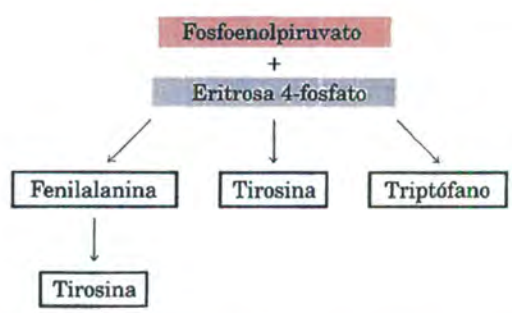
El tratamiento combinado resulta en la remisión de más del 95% de los casos de ALL infantil (el tratamiento solamente con L-asparaginasa resulta en la remisión de entre el 40% y el 60% de los casos). Sin embargo, el tratamiento con asparaginasa tiene efectos secundarios perjudiciales y alrededor del 10% de los pacientes recuperados sufren recaídas con tumores resistentes al tratamiento. Se están desarrollando inhibidores de la asparagina sintetasa humana para mejorar la terapia contra la ALL infantil. ■

La metionina, la treonina, la lisina, la isoleucina, la valina y la leucina son aminoácidos esenciales. Sus rutas biosintéticas son complejas y están interconectadas **(Fig. 22–15)**. En algunos casos, las vías de las bacterias, los hongos y las plantas difieren significativamente. Las rutas de las bacterias se muestran en la Figura 22–15.

El aspartato da lugar a **metionina**, **treonina** y **lisina.** Los puntos de ramificación se encuentran en el aspartato β-semialdehído, un intermediario de las tres vías, y en la homoserina, un precursor de la treonina y la metionina. La treonina es a su vez uno de los precursores de la isoleucina. Las vías de la **valina** y de la **isoleucina** comparten cuatro enzimas (Fig. 22–15, pasos (18) a (21)).

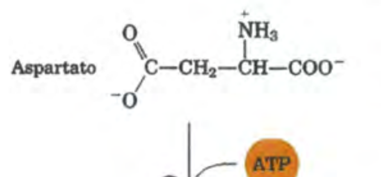
El piruvato da lugar a valina y a isoleucina a través de rutas que empiezan por la condensación de dos átomos de carbono del piruvato (en forma de hidroxietil tiamina pirofosfato; véase la Fig. 14–14) con otra molécula de piruvato (ruta de la valina) o con α-cetobutirato (ruta de la isoleucina). El α-cetobutirato se forma a partir de la treonina en una reacción que requiere piridoxal fosfato (Fig. 22–15, paso (17)). Un intermediario de la vía de la valina, el α-cetoisovalerato, es el punto de partida de una vía colateral que en cuatro pasos conduce a la **leucina** (pasos (22) a (25)).

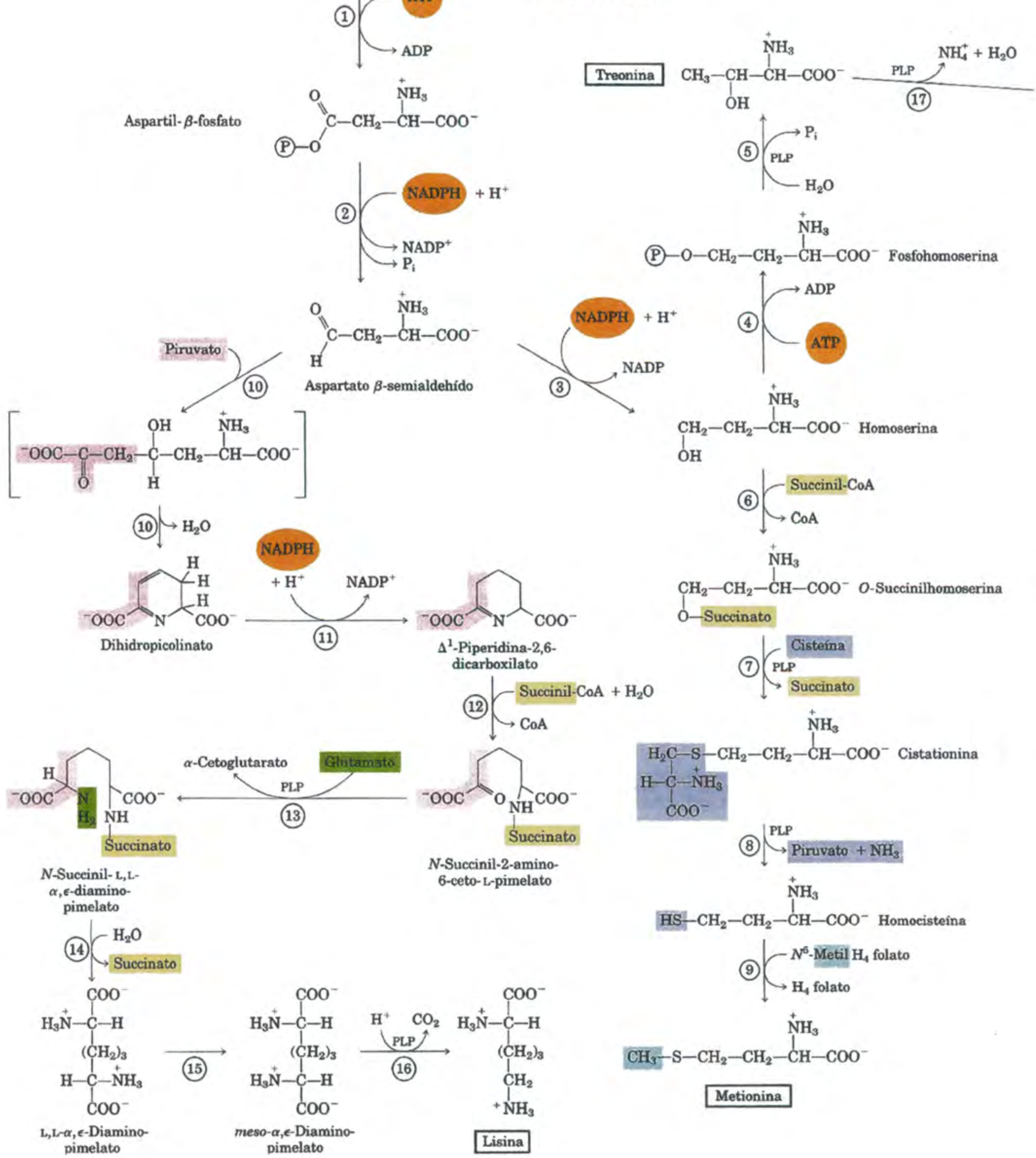
El corismato es un intermediario clave en la síntesis del triptófano, de la fenilalanina y de la tirosina

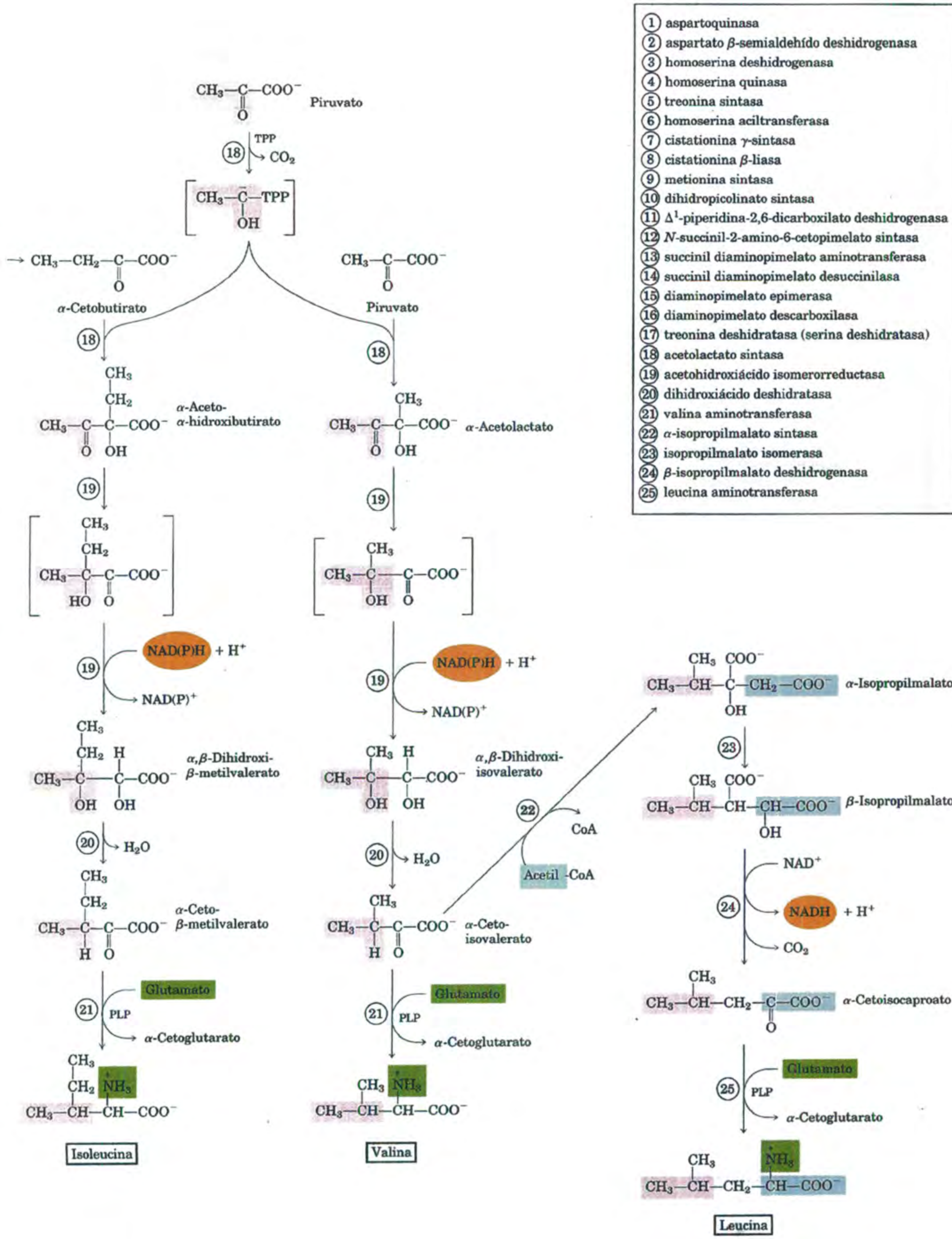


Los anillos aromáticos no son fácilmente asequibles en el medio, a pesar de que el anillo del benceno es muy estable. La ruta ramificada que conduce al triptófano, la fenilalanina y la tirosina en bacterias, hongos y plantas es la vía biológica principal para la formación del anillo aromático. Consiste en el cierre en anillo de un precursor alifático seguido de la adición secuencial de dobles enlaces. Los primeros cuatro pasos conducen al shiquimato, cuyos siete carbonos proceden de la eritrosa 4-fosfato y

FIGURA 22–15 Biosíntesis de seis aminoácidos esenciales a partir de oxalacetato y piruvato en bacterias: metionina, treonina, lisina, isoleucina, valina y leucina. Aquí, al igual que en otras rutas con múltiples pasos, los enzimas se indican en la clave. Observe que el L,L-α,ϵ-diaminopimelato, el producto del paso (14), es simétrico. Los carbonos que proceden del piruvato (y el grupo amino derivado del glutamato) no han sido seguidos más allá de este punto, puesto que las siguientes reacciones pueden colocarlos en cualquiera de los extremos de la molécula de lisina.







① aspartoquinasa
② aspartato β-semialdehído deshidrogenasa
③ homoserina deshidrogenasa
④ homoserina quinasa
⑤ treonina sintasa
⑥ homoserina aciltransferasa
⑦ cistationina γ-sintasa
⑧ cistationina β-liasa
⑨ metionina sintasa
⑩ dihidropicolinato sintasa
⑪ Δ¹-piperidina-2,6-dicarboxilato deshidrogenasa
⑫ N-succinil-2-amino-6-cetopimelato sintasa
⑬ succinil diaminopimelato aminotransferasa
⑭ succinil diaminopimelato desuccinilasa
⑮ diaminopimelato epimerasa
⑯ diaminopimelato descarboxilasa
⑰ treonina deshidratasa (serina deshidratasa)
⑱ acetolactato sintasa
⑲ acetohidroxiácido isomerorreductasa
⑳ dihidroxiácido deshidratasa
㉑ valina aminotransferasa
㉒ α-isopropilmalato sintasa
㉓ isopropilmalato isomerasa
㉔ β-isopropilmalato deshidrogenasa
㉕ leucina aminotransferasa
Piruvato
TPP
CO2
α-Cetobutirato
Piruvato
α-Aceto-α-hidroxibutirato
α-Acetolactato
NAD(P)H + H+
NAD(P)+
α,β-Dihidroxi-β-metilvalerato
α,β-Dihidroxi-isovalerato
H2O
α-Ceto-β-metilvalerato
α-Ceto-isovalerato
Glutamato
PLP
α-Cetoglutarato
Isoleucina
Valina
CoA
Acetil-CoA
α-Isopropilmalato
β-Isopropilmalato
NAD+
NADH + H+
CO2
α-Cetoisocaproato
Leucina

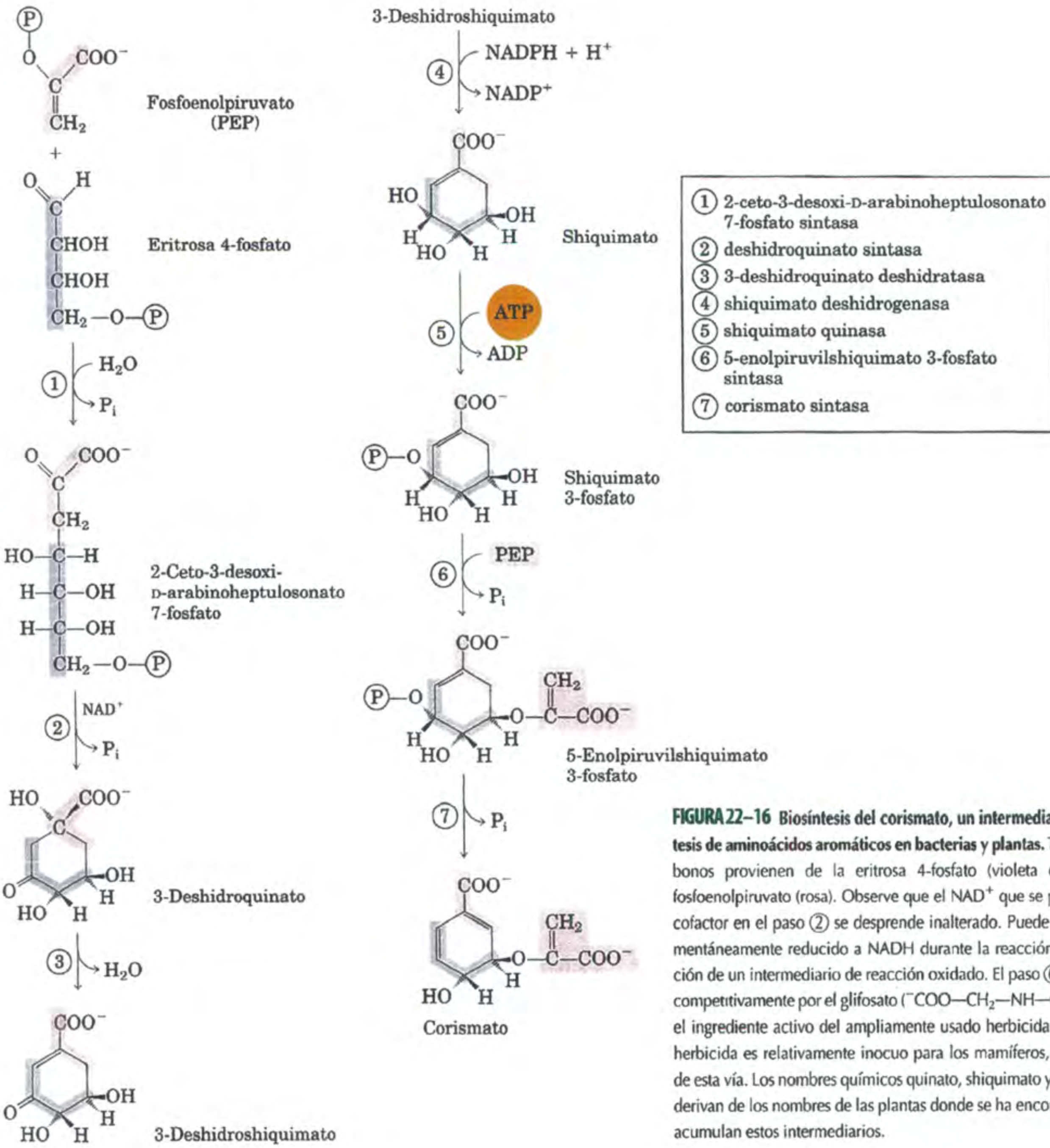


FIGURA 22–16 Biosíntesis del corismato, un intermediario de la síntesis de aminoácidos aromáticos en bacterias y plantas. Todos los carbonos provienen de la eritrosa 4-fosfato (violeta claro) o del fosfoenolpiruvato (rosa). Observe que el NAD^+ que se precisa como cofactor en el paso ② se desprende inalterado. Puede que sea momentáneamente reducido a NADH durante la reacción, con formación de un intermediario de reacción oxidado. El paso ⑥ es inhibido competitivamente por el glifosato ($^-COO—CH_2—NH—CH_2—PO_3^{2-}$), el ingrediente activo del ampliamente usado herbicida Roundup. El herbicida es relativamente inocuo para los mamíferos, que carecen de esta vía. Los nombres químicos quinato, shiquimato y corismato se derivan de los nombres de las plantas donde se ha encontrado que se acumulan estos intermediarios.

del fosfoenolpiruvato **(Fig. 22–16)**. El shiquimato se convierte en corismato en tres pasos, en los cuales se incorporan otros tantos átomos de carbono procedentes de otra molécula de fosfoenolpiruvato. El corismato es el primer punto de ramificación de la vía, con una rama que conduce al triptófano y otra a la fenilalanina y a la tirosina.

En la rama del **triptófano (Fig. 22–17)**, el corismato se convierte en antranilato. En esta reacción la glutamina proporciona el nitrógeno que formará parte integrante del anillo de indol. El antranilato se condensa a continuación con el PRPP. El anillo indólico del triptófano se forma a partir de los carbonos del anillo y del grupo amino del antranilato más dos carbonos procedentes del PRPP. La reacción final de la secuencia está catalizada por la **triptófano sintasa.** Este enzima tiene una estructura en subunidades $\alpha_2\beta_2$ y puede disociarse en dos subunidades α y una subunidad β_2 que catalizan diferentes partes de la reacción global:

$$\text{Indol-3-glicerol fosfato} \xrightarrow[\text{subunidad } \alpha]{} \text{indol} + \text{gliceraldehído 3-fosfato}$$

$$\text{Indol} + \text{serina} \xrightarrow[\text{subunidad } \beta_2]{} \text{triptófano} + H_2O$$

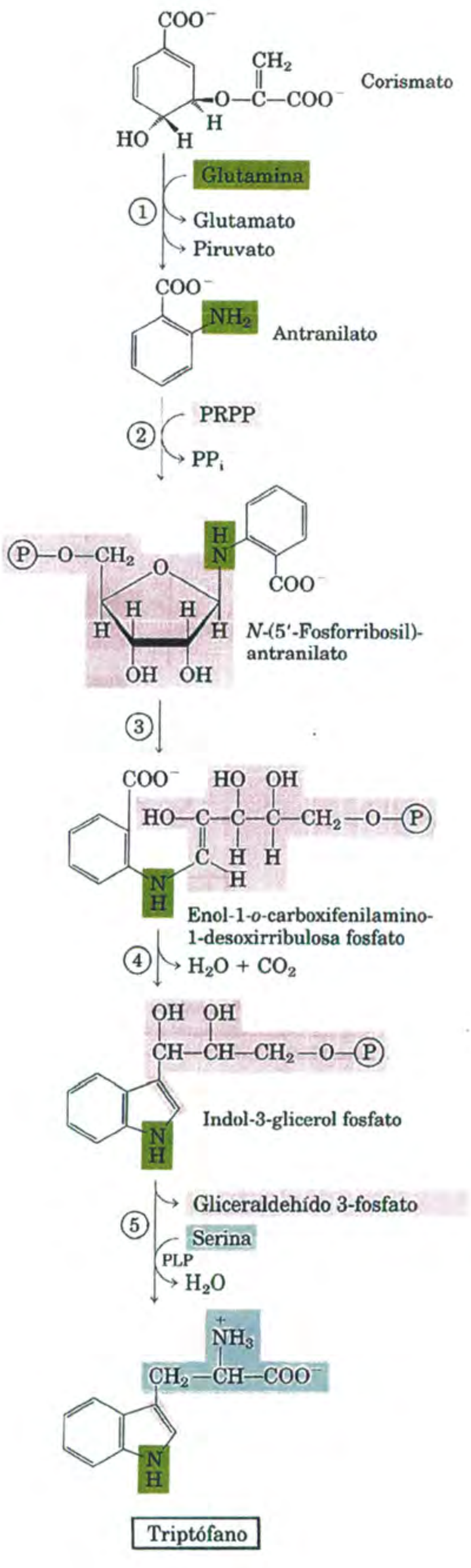


FIGURA 22–17 Biosíntesis del triptófano a partir del corismato en bacterias y plantas. En *E. coli* los enzimas que catalizan los pasos (1) y (2) son subunidades de un mismo complejo.

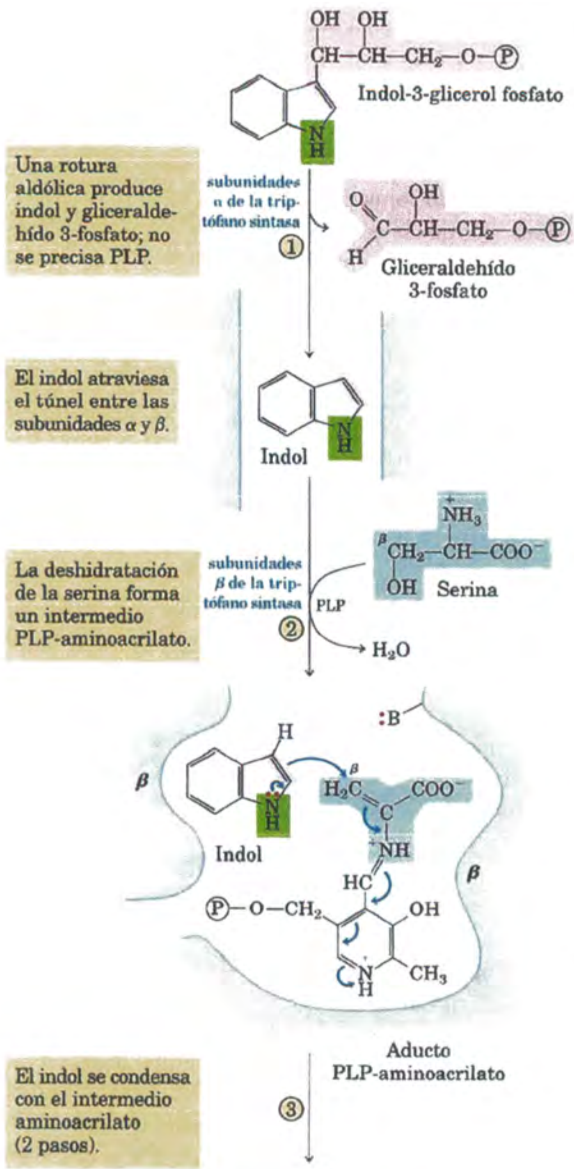
La segunda parte de la reacción requiere piridoxal fosfato **(Fig. 22–18)**. El indol formado en el primer paso no es liberado por el enzima, sino que se desplaza a través de un canal desde el sitio activo de la subunidad α hasta el sitio activo de la subunidad β, donde se condensa con un producto intermediario, del tipo base de Schiff, derivado de la serina y del PLP. Esta forma de canalizar los compuestos intermediarios puede ser una característica del conjunto de la vía del corismato al triptófano. Los sitios activos enzimáticos que catalizan los distintos pasos (a veces no secuenciales) de la vía hasta el triptófano se encuentran en una misma cadena polipeptídica en algunos hongos y bacterias, pero en otras especies se encuentran en proteínas separadas. Además, la actividad de algunos de estos enzimas precisa una asociación no covalente con otros enzimas de la vía. Estas observaciones sugieren que todas las actividades enzimáticas de la vía forman parte de un gran complejo multienzimático, tanto en las bacterias como en los organismos eucariotas. Aunque estos complejos generalmente no se mantienen intactos cuando se aíslan los enzimas utilizando procedimientos bioquímicos tradicionales, cada vez hay más pruebas experimentales de la existencia de complejos multienzimáticos para ésta y otras vías metabólicas (p. 619).

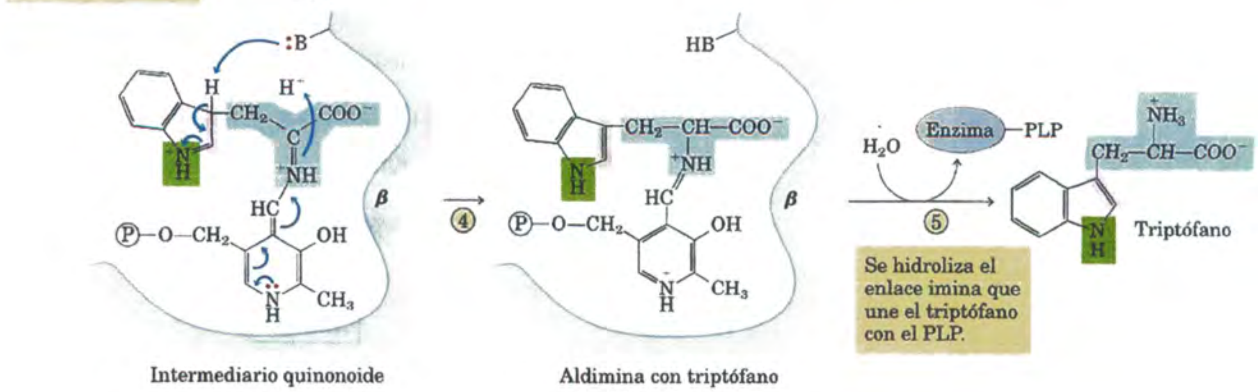
En las plantas y en las bacterias, la **fenilalanina** y la **tirosina** se sintetizan a partir de corismato a través de vías menos complejas que la del triptófano. El intermediario común es el prefenato **(Fig. 22–19)**. El último paso en ambos casos es la transaminación con glutamato.

Los animales pueden producir tirosina directamente a partir de la fenilalanina por hidroxilación del grupo fenilo en C-4 por la **fenilalanina hidroxilasa;** este enzima también participa en la degradación de la fenilalanina (véanse las Figs. 18–23 y 18–24). La tirosina se considera un aminoácido condicionalmente esencial o no esencial, en la medida en que puede sintetizarse a partir del aminoácido esencial fenilalanina.

La biosíntesis de la histidina utiliza precursores de la biosíntesis de purinas

La vía de la **histidina** en todas las plantas y bacterias difiere en varios aspectos de las vías biosintéticas de otros aminoácidos. La histidina proviene de tres precursores **(Fig. 22–20)**: el PRPP aporta cinco carbonos, el anillo purínico del ATP aporta un nitrógeno y un carbono mientras que el segundo nitrógeno del anillo proviene de la glutamina. Los pasos clave son la





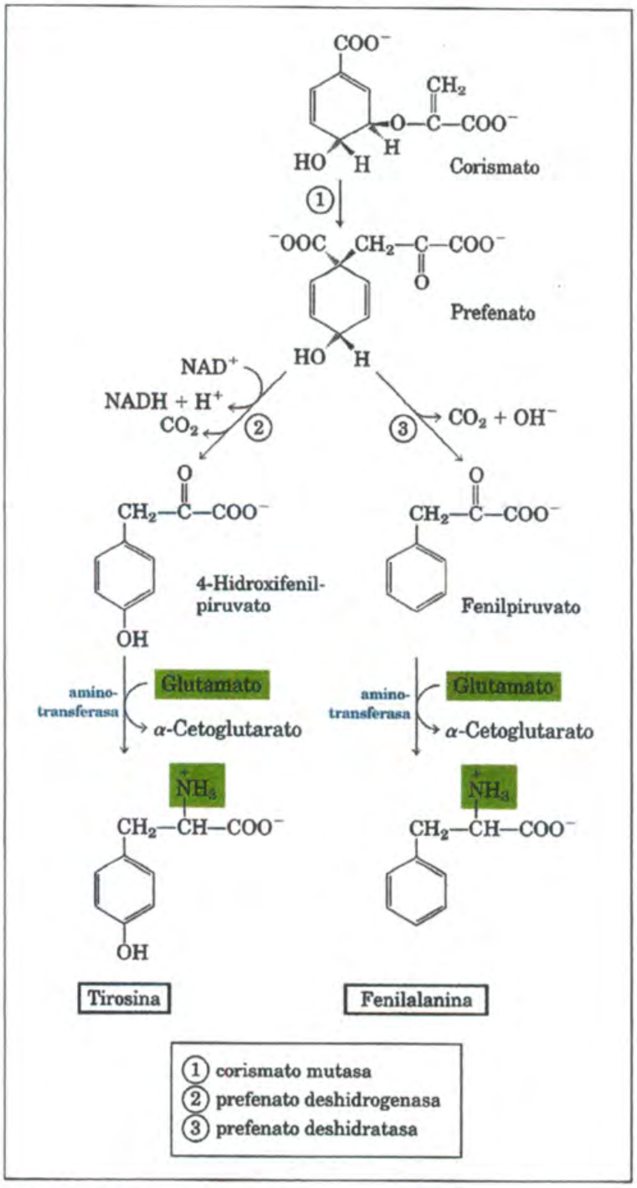


FIGURA 22–19 Biosíntesis de la fenilalanina y la tirosina a partir del corismato en bacterias y plantas. La conversión del corismato en prefenato es un ejemplo biológico raro de una reordenación de Claisen.

FIGURA DE MECANISMO 22–18 Reacción de la triptófano sintasa. Este enzima cataliza una reacción de múltiples pasos con diferentes tipos de reordenaciones químicas. Estas transformaciones facilitadas por el PLP tienen lugar en el carbono β (C-3) del aminoácido, contrariamente a las reacciones en el carbono α descritas en la Fig. 18–6. El carbono β de la serina se incorpora al anillo indol.

Mecanismo de la triptófano sintasa

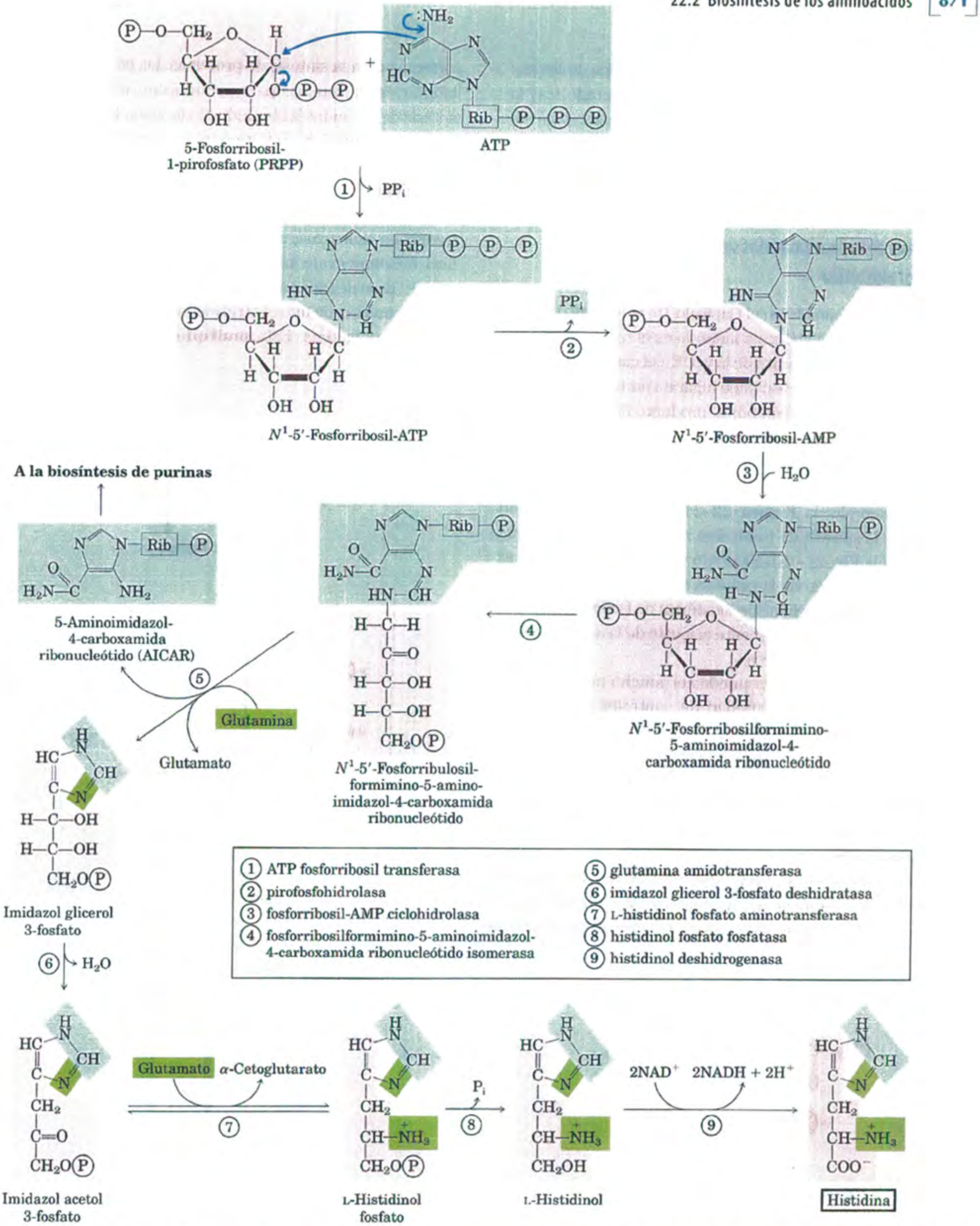


FIGURA 22–20 Biosíntesis de la histidina en bacterias y plantas. Los átomos que proceden del PRPP y el ATP están sombreados en rojo y azul, respectivamente. Dos de los nitrógenos de la histidina provienen de la glutamina y del glutamato (en verde). Observe que el derivado del ATP que se forma tras el paso ⑤ (AICAR) es un intermediario en la biosíntesis de purinas (véase la Fig. 22–33, paso ⑨), de modo que el ATP se regenera rápidamente.

condensación del ATP y del PRPP, en la que el N-1 del anillo de la purina se une al C-1 activado de la ribosa del PRPP (paso ① en la Fig. 22–20); la apertura del anillo de purina que al final deja el N-1 y el C-2 de la adenina unidos a la ribosa (paso ③) y la formación del anillo de imidazol en una reacción en la que la glutamina aporta un nitrógeno (paso ⑤). La utilización del ATP como metabolito en lugar de como cofactor de alta energía es poco habitual, pero no es un derroche de energía, puesto que

este proceso está conectado con la ruta biosintética de las purinas. El resto de la molécula de ATP que es liberado tras la transferencia del N-1 y del C-2 es el 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR), un intermediario de la biosíntesis de las purinas (véase la Fig. 22–33), que se recicla rápidamente a ATP.

La biosíntesis de los aminoácidos se encuentra bajo control alostérico

Tal como se ha examinado en el Capítulo 15, el control del flujo a través de una vía metabólica a menudo es el reflejo de la actividad de los múltiples enzimas de la vía. En el caso de la síntesis de aminoácidos, la regulación tiene lugar en parte por retroinhibición de la primera reacción por el producto final de la vía. La primera reacción normalmente está catalizada por un enzima alostérico que juega un importante papel en el control global del flujo a través de la vía.

Como ejemplo, la **Figura 22–21** muestra la regulación alostérica de la síntesis de isoleucina a partir de treonina (que se detalla en la Fig. 22–15). El producto final, la isoleucina, es un inhibidor alostérico de la primera reacción de la secuencia. En las bacterias, tal modulación alostérica de la síntesis de aminoácidos controla constantemente el ajuste de la actividad de la vía a las necesidades celulares.

La regulación alostérica puede ser mucho más compleja. Un ejemplo es la amplia variedad de controles alostéricos a los que está sometida la actividad de la glutamina sintetasa de *E. coli* (Fig. 22–6). Seis productos derivados de la glutamina actúan como moduladores de retroalimentación negativa del enzima, siendo los efectos globales de estos y otros moduladores más que aditivos. Este tipo de regulación se denomina **inhibición concertada.**

Existen otros mecanismos que contribuyen a la regulación de las rutas biosintéticas de los aminoácidos. Puesto que los 20 aminoácidos estándar deben producirse en las proporciones correctas para la síntesis de proteínas, las células han desarrollado diversos sistemas para controlar no sólo la velocidad de síntesis de los aminoácidos individuales sino también para coordinar su producción. Este tipo de coordinación está especialmente bien desarrollado en las células bacterianas en rápido crecimiento. La **Figura 22–22** muestra cómo las células de *E. coli* coordinan la síntesis de los aminoácidos lisina, metionina, treonina e isoleucina, todos ellos sintetizados a partir de aspartato. Resultan evidentes varios patrones importantes de inhibición. El paso de aspartato a aspartil-β-fosfato está catalizado por tres isozimas, cada uno controlado independientemente por distintos moduladores. Esta **multiplicidad enzimática** impide

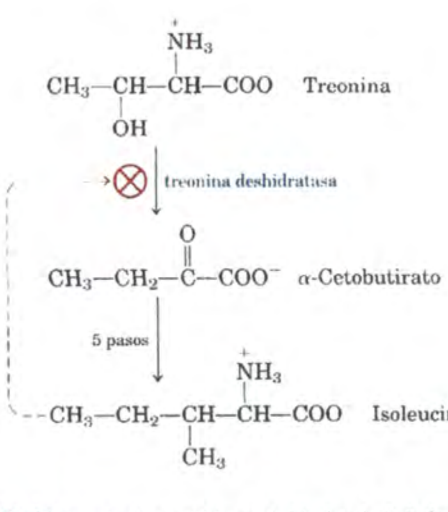


FIGURA 22–21 Regulación alostérica de la biosíntesis de isoleucina. La primera reacción en la vía que va de la treonina a la isoleucina está inhibida por el producto final, la isoleucina. Éste fue uno de los primeros ejemplos de retroinhibición alostérica descubiertos. Los pasos del α-cetobutirato hasta la isoleucina corresponden a los pasos (18) a (21) de la Fig. 22–15 (cinco pasos porque el (19) es una reacción en dos etapas).

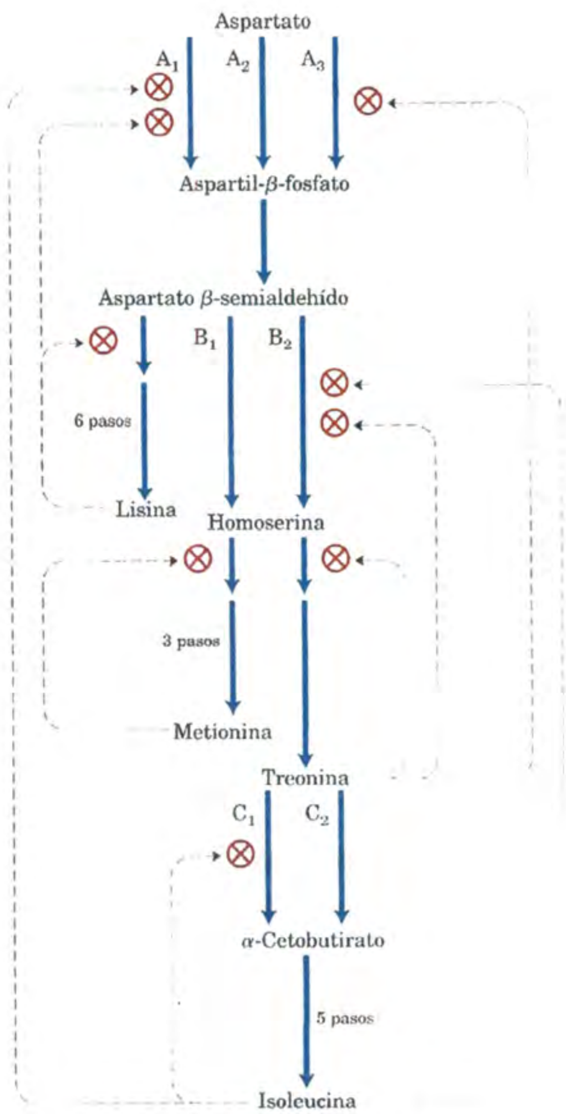


FIGURA 22–22 Interconexión de los mecanismos de regulación de la biosíntesis de varios aminoácidos derivados del aspartato en *E. coli*. Tres enzimas (A, B, C) poseen dos o tres formas isozimáticas, indicadas por subíndices numéricos. En cada caso, uno de los isozimas (A_2, B_1 y C_2) no posee regulación alostérica: estos isozimas se regulan por cambios en las cantidades sintetizadas (Capítulo 28). La síntesis de los isozimas A_2 y B_1 se reprime cuando los niveles de metionina son altos, y la síntesis del isozima C_2 se reprime cuando son elevados los niveles de isoleucina. El enzima A es la aspartoquinasa; el B, la homoserina deshidrogenasa; el C, la treonina deshidratasa.

que un producto final obstaculice pasos clave de una vía metabólica cuando se precisan otros productos de la misma vía. Los pasos de aspartato β-semialdehído a homoserina y de treonina a α-cetobutirato (detallados en la Fig. 22–15) también están catalizados por dos isozimas, que son controlados independientemente. Uno de los isozimas para la conversión del aspartato a aspartil-β-fosfato es inhibido alostéricamente por dos moduladores distintos, la lisina y la isoleucina, cuya actuación conjunta es más que aditiva, hecho que constituye otro ejemplo de inhibición concertada. La secuencia del aspartato a la isoleucina tiene múltiples etapas de retroinhibición negativa solapadas; por ejemplo, la isoleucina inhibe la conversión de la treonina en α-cetobutirato (tal como se ha descrito anteriormente), mientras que la treonina inhibe su propia formación en tres puntos: a partir de la homoserina, a partir del aspartato β-semialdehído y a partir de aspartato (pasos ④, ③ y ① en la Fig. 22–15). Este mecanismo global de regulación se conoce como **retroinhibición secuencial.**

Se encuentran patrones similares en las rutas que conducen a los aminoácidos aromáticos. El primer paso de la ruta que conduce inicialmente al intermediario común corismato está catalizado por el enzima 2-ceto-3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintasa (paso ① de la Fig. 22–16). La mayoría de microorganismos y plantas tienen tres isozimas de la DAHP sintasa. Uno de ellos es inhibido alostéricamente (retroinhibición) por fenilalanina, otro por tirosina y el tercero por triptófano. Este esquema ayuda a que la ruta global responda a las necesidades de uno o más aminoácidos. Hay puntos de regulación adicionales después de que la vía se ramifique en el corismato. Por ejemplo, los enzimas que catalizan los dos primeros pasos de la rama del triptófano están sujetos a inhibición alostérica por el triptófano.

RESUMEN 22.2 Biosíntesis de los aminoácidos

- Las plantas y las bacterias sintetizan los 20 aminoácidos estándar. Los mamíferos pueden sintetizar alrededor de la mitad; los otros son necesarios en la dieta (aminoácidos esenciales).
- Entre los aminoácidos no esenciales, el glutamato se forma por aminación reductora del α-cetoglutarato y sirve de precursor de la glutamina, la prolina y la arginina. La alanina y el aspartato (y, por tanto, la asparagina) se forman a partir del piruvato y el oxalacetato, respectivamente, por transaminación. La cadena carbonada de la serina procede del 3-fosfoglicerato. La serina es un precursor de la glicina; el átomo de carbono β de la serina se transfiere al tetrahidrofolato. En los microorganismos, la cisteína se sintetiza a partir de serina y del sulfuro producido por reducción del sulfato ambiental. Los mamíferos sintetizan la cisteína a partir de la metionina y de la serina mediante una serie de reacciones que requieren *S*-adenosilmetionina y cistationina.
- Entre los aminoácidos esenciales, los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) se forman a través de una ruta en la que el corismato ocupa un punto clave de ramificación. El fosforribosil pirofosfato es un precursor del triptófano y de la histidina. La ruta hasta la histidina está interconectada con la vía de síntesis de las purinas. La tirosina también se puede formar a partir de la fenilalanina (por lo que se considera condicionalmente esencial). Las rutas hacia los restantes aminoácidos esenciales son complejas.
- Las rutas de biosíntesis de los aminoácidos están sujetas a inhibición alostérica por producto final; el enzima regulador es habitualmente el primero de la secuencia. La regulación de las diversas rutas biosintéticas está coordinada.

22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos

Además de su papel como bloques de construcción de las proteínas, los aminoácidos son los precursores de muchas biomoléculas especializadas, entre las que se encuentran hormonas, coenzimas, nucleótidos, alcaloides, polímeros de las paredes celulares, porfirinas, antibióticos, pigmentos y neurotransmisores. Se describirán a continuación las rutas biosintéticas de algunos de estos derivados de los aminoácidos.

La glicina es un precursor de las porfirinas

La biosíntesis de las **porfirinas,** de las cuales la glicina es un precursor principal, constituye nuestro primer ejemplo por la importancia central del núcleo de porfirina para las hemoproteínas, tales como la hemoglobina y los citocromos. Las porfirinas se fabrican a partir de cuatro moléculas del derivado monopirrólico **porfobilinógeno,** que a su vez procede de dos moléculas de δ-aminolevulinato. Existen dos rutas principales para el δ-aminolevulinato. En los eucariotas superiores **(Fig. 22–23a)** la glicina reacciona con el succinil-CoA en el primer paso para dar α-amino-β-cetoadipato, que a continuación se descarboxila para dar δ-aminolevulinato. En las plantas, algas y la mayoría de bacterias, el δ-aminolevulinato se forma a partir del glutamato (Fig. 22–23b). El glutamato se esterifica primero a glutamil-$tRNA^{Glu}$ (consúltese el Capítulo 27 para el tema de los RNA de transferencia); la reducción mediante NADPH convierte el glutamato en glutamato 1-semialdehído, que es cortado del tRNA. Una aminotransferasa convierte el glutamato 1-semialdehído en δ-aminolevulinato.

En todos los organismos se condensan dos moléculas de δ-aminolevulinato para formar porfobilinógeno y, a través de una serie de reacciones enzimáticas complejas, se unen cuatro moléculas de porfobilinógeno para formar **protoporfirina (Fig. 22–24)**. El átomo de hierro se incorpora después del ensamblaje de la protoporfirina, en una etapa catalizada por la ferroquelatasa. La biosíntesis de la porfirina se regula en los eucariotas superiores por la concentración del producto hemo, que actúa como retroinhibidor de los primeros pasos de la ruta de biosíntesis.

Los defectos genéticos en la biosíntesis de las porfirinas pueden causar la acumulación de intermediarios de la ruta, que provocan diversas enfermedades conocidas genéricamente como **porfirias** (Recuadro 22–2).

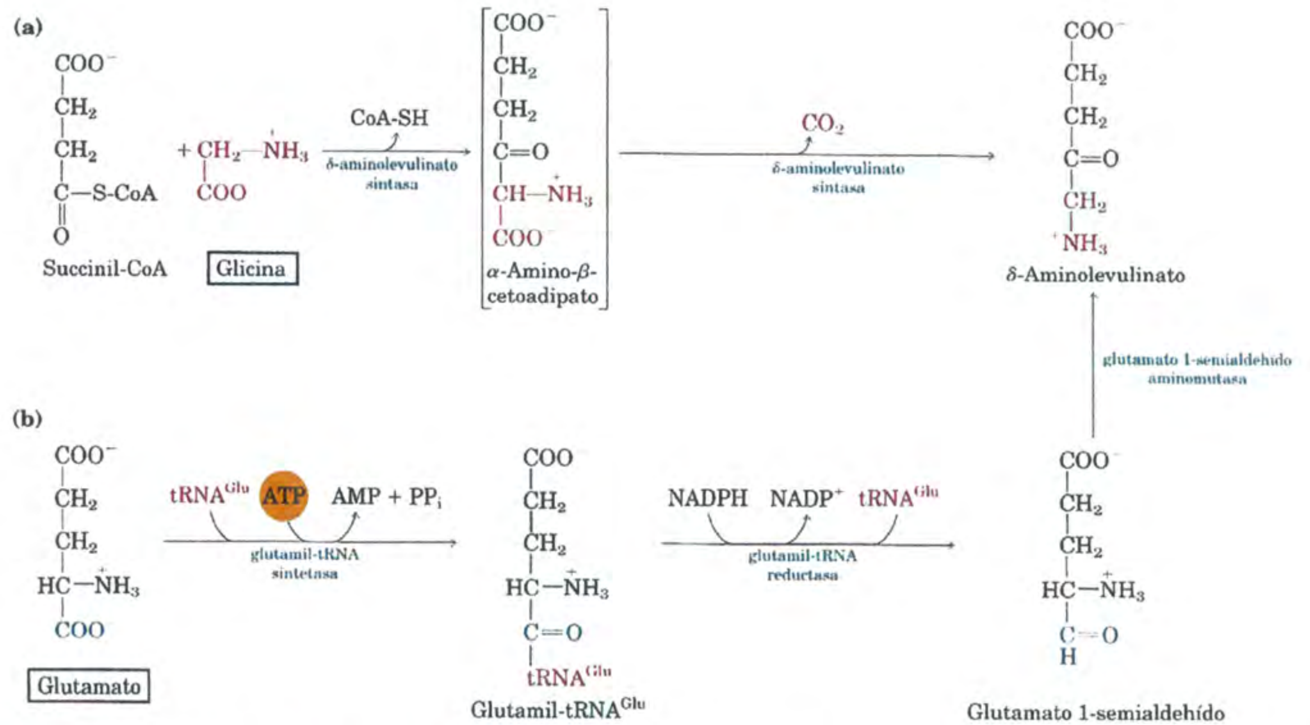


FIGURA 22–23 Biosíntesis de δ-aminolevulinato. (a) En la mayoría de animales, mamíferos incluidos, el δ-aminolevulinato se sintetiza a partir de glicina y succinil-CoA. Los átomos aportados por la glicina se muestran en rojo. **(b)** En bacterias y plantas, el precursor del δ-aminolevulinato es el glutamato.

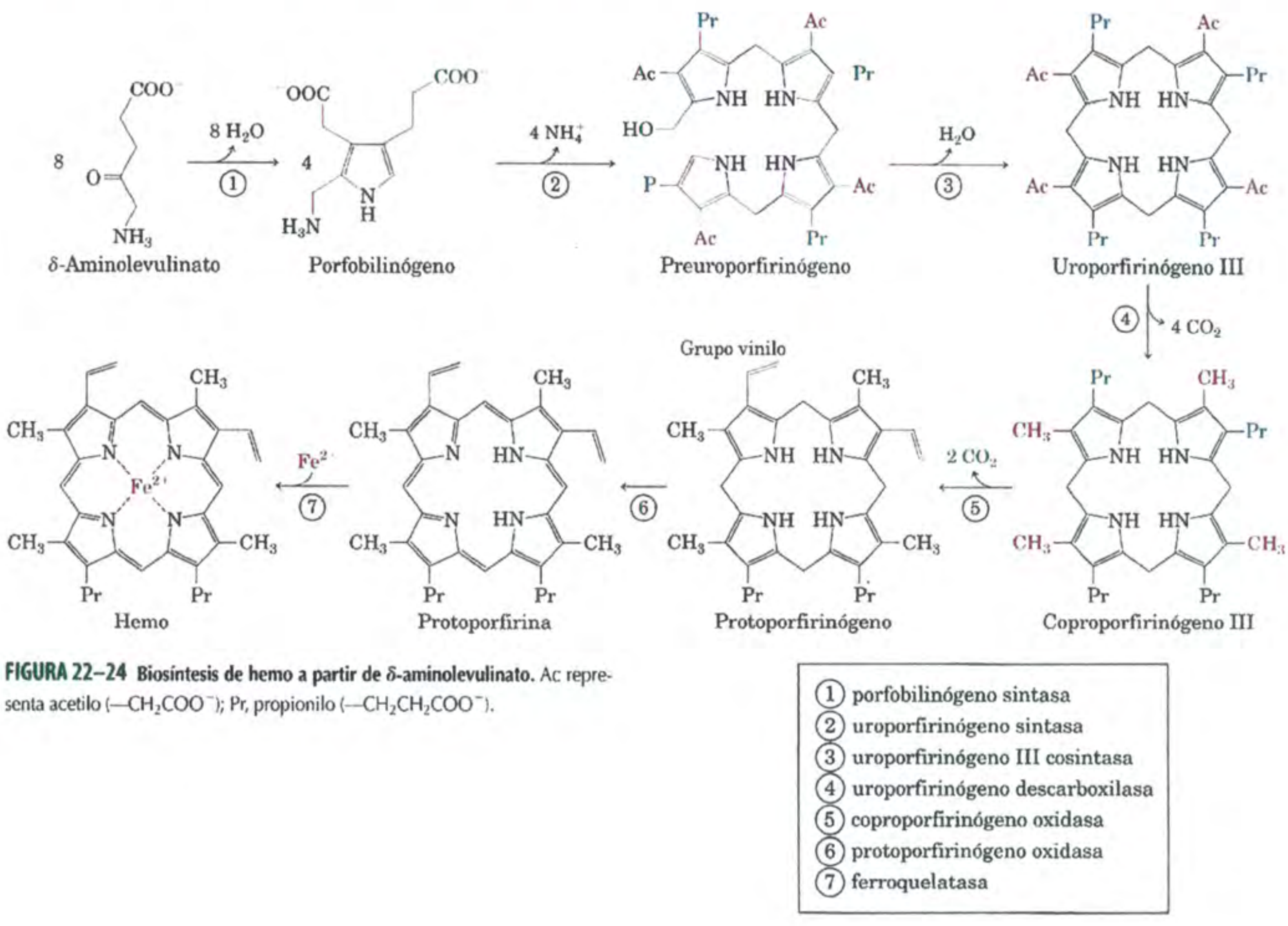


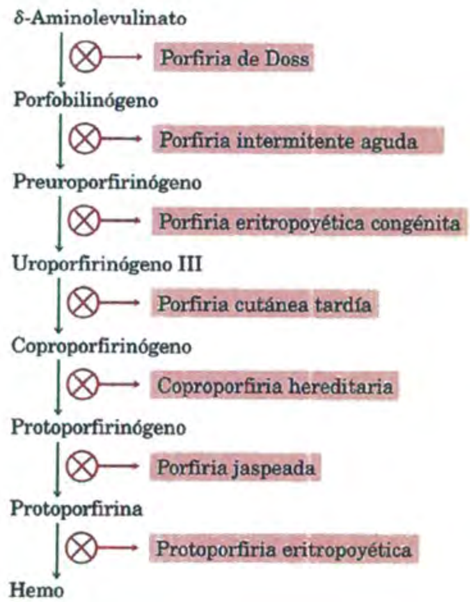
FIGURA 22–24 Biosíntesis de hemo a partir de δ-aminolevulinato. Ac representa acetilo ($—CH_2COO^-$); Pr, propionilo ($—CH_2CH_2COO^-$).

RECUADRO 22-2 MEDICINA Sobre reyes y vampiros

Las porfirias son un grupo de enfermedades genéticas caracterizado por defectos en enzimas de la vía de síntesis de las porfirinas a partir de la glicina, que provocan la acumulación de precursores específicos de las porfirinas en los eritrocitos, los fluidos corporales y el hígado. La forma más común es la porfiria intermitente aguda. La mayoría de los afectados son heterozigotos y normalmente son asintomáticos, porque una sola copia del gen normal garantiza un nivel suficiente de actividad enzimática. Sin embargo, ciertos factores ambientales o nutricionales (aún poco conocidos) pueden ser causa de una acumulación de δ-aminolevulinato y de porfobilinógeno en estos individuos, que produce ataques agudos de dolor abdominal y disfunciones neurológicas. El rey Jorge III, monarca británico durante la Revolución Americana, sufrió varios ataques de locura aparente, que perjudicaron la imagen de un hombre por lo demás inteligente y sensato. Los síntomas de su dolencia sugieren que Jorge III sufría de porfiria intermitente aguda.

Una de las porfirias más infrecuentes da lugar a la acumulación de uroporfirinógeno I, un isómero anormal de un precursor de la protoporfirina. Este compuesto tiñe la orina de rojo, provoca una fuerte fluorescencia de los dientes a la luz ultravioleta y hace que la piel sea anormalmente sensible a la luz solar. Muchos individuos con esta porfiria son anémicos porque no se sintetiza suficiente hemo. Esta dolencia genética puede haber originado el mito popular de los vampiros.

Los síntomas de la mayoría de las porfirias son hoy día fácilmente controlables con cambios en la dieta o con administración de hemo o de hemoderivados.



El hemo es la fuente de los pigmentos biliares

La ferroporfirina (hemo) de la hemoglobina, liberada en el bazo por los eritrocitos muertos, se degrada proporcionando Fe^{2+} libre y finalmente **bilirrubina.** Esta ruta es atractiva porque confiere color a la bioquímica humana.

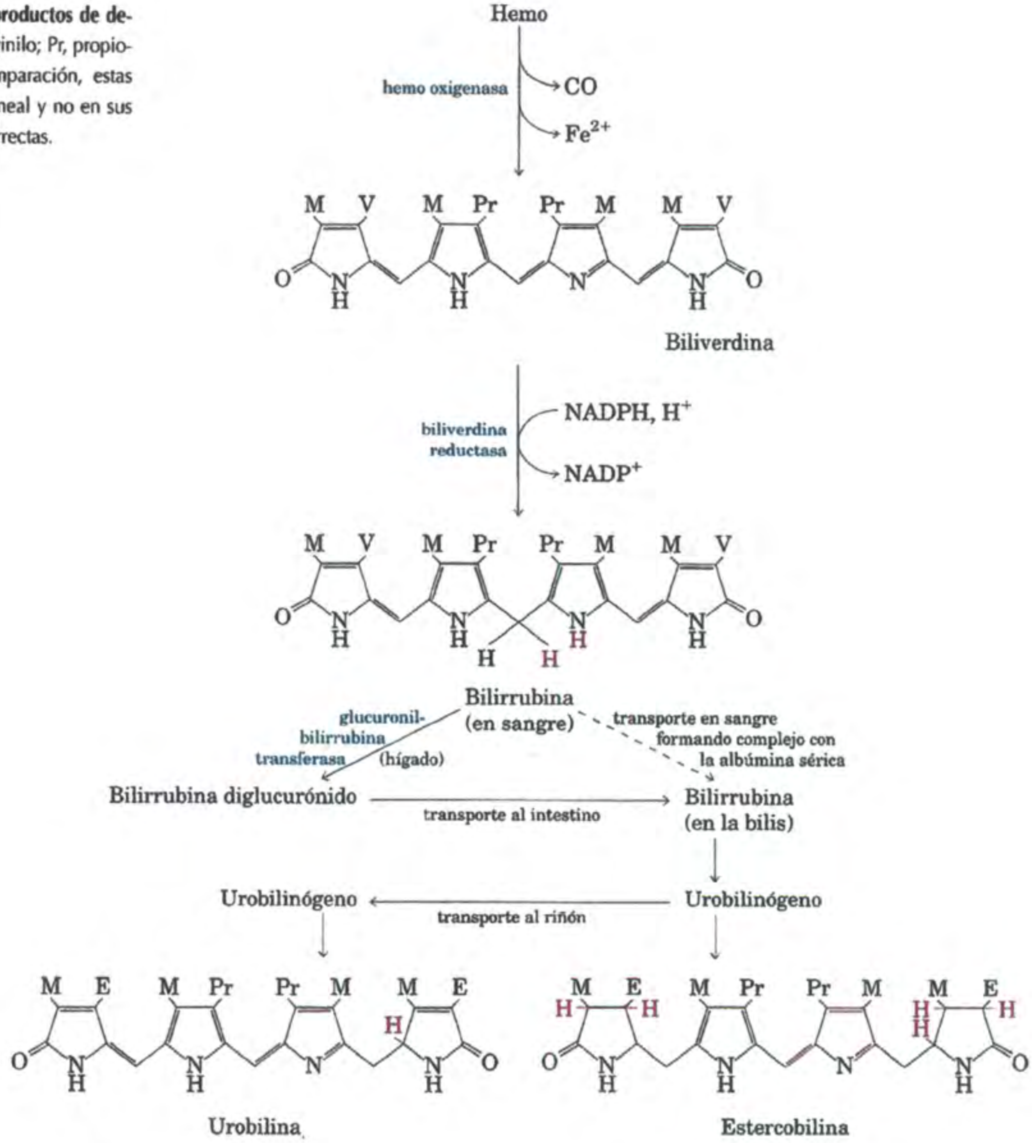
El primer paso en la ruta de dos pasos, catalizado por la hemo oxigenasa, convierte el hemo en biliverdina, un derivado tetrapirrólico lineal (abierto) **(Fig. 22–25)**. Los otros productos de la reacción son Fe^{2+} y CO. El Fe^{2+} se une rápidamente a la ferritina. El monóxido de carbono es un veneno que se une a la hemoglobina (véase el Recuadro 5–1), y la producción de CO por la hemo oxigenasa asegura que, incluso en ausencia de exposición al ambiente, alrededor de un 1% del hemo de un individuo esté unido al CO.

La biliverdina se convierte en bilirrubina en el segundo paso, catalizado por la biliverdina reductasa. Esta reacción se puede seguir colorimétricamente en un experimento familiar in situ. Cuando se sufre una contusión el color negro y/o púrpura que aparece se debe a la hemoglobina liberada por los eritrocitos dañados. Con el tiempo, el color pasa al verde de la biliverdina y posteriormente al amarillo de la bilirrubina. La bilirrubina es muy insoluble y viaja por el torrente sanguíneo unida a la seroalbúmina. En el hígado, la bilirrubina se transforma en el pigmento biliar bilirrubina diglucurónido. Este producto es lo bastante hidrosoluble para ser secretado, junto a otros componentes de la bilis, en el intestino delgado, donde enzimas microbianos lo convierten en varios productos, mayoritariamente urobilinógeno. Parte del urobilinógeno se reabsorbe en la sangre y se transporta al riñón, en donde se convierte en urobilina, el compuesto que da a la orina su color amarillo (Fig. 22–25, rama izquierda). El urobilinógeno que permanece en el intestino se convierte (en otra reacción dependiente de microbios) en estercobilina (Fig. 22–25, rama derecha), que da a las heces el color marrón rojizo.

Un mal funcionamiento hepático o un bloqueo de la secreción biliar es causa de que la bilirrubina del hígado llegue a la sangre, lo que produce el amarilleo de la piel y del globo ocular, dolencia conocida como ictericia. La determinación de la concentración sanguínea de bilirrubina en los casos de ictericia resulta útil para el diagnóstico de la enfermedad hepática subyacente. Los recién nacidos tienen a veces ictericia debido a que no han producido aún suficiente glucuronil bilirrubina transferasa para modificar su bilirrubina. Un tratamiento tradicional para disminuir el exceso de bilirrubina consiste en la exposición a una lámpara fluorescente, que produce una conversión fotoquímica de la bilirrubina en compuestos que son más solubles y que se excretan más fácilmente.

Estas rutas de degradación del hemo juegan papeles significativos en la protección de las células contra las lesiones oxidativas y en la regulación de ciertas funciones celulares. El CO producido por la hemo oxigenasa es tóxico a concentraciones elevadas, pero a las concentraciones extremadamente bajas generadas durante la degradación del hemo podría tener una fun-

FIGURA 22–25 Bilirrubina y sus productos de degradación. M representa metilo; V, vinilo; Pr, propionilo; E, etilo. Para facilitar la comparación, estas estructuras se muestran en forma lineal y no en sus conformaciones estereoquímicas correctas.



ción reguladora y/o señalizadora. Tiene un efecto vasodilatador, muy parecido (aunque menos potente) al del óxido nítrico (que se discute más adelante). Concentraciones bajas de CO también tienen algunos efectos reguladores sobre la neurotransmisión. La bilirrubina es el antioxidante más abundante en los tejidos de mamíferos y es responsable de la mayor parte de la actividad antioxidante del suero. Sus efectos protectores parecen ser muy importantes en el desarrollo del cerebro de los niños recién nacidos. La toxicidad celular asociada con la ictericia puede ser debida a niveles de bilirrubina superiores a la albúmina sérica necesaria para solubilizarla.

Debido a estas variadas misiones de los productos de degradación del hemo, la ruta degradativa está sujeta a regulación, principalmente en el primer paso. Los humanos tienen al menos tres isozimas de la hemo oxigenasa (HO). La HO-1 está fuertemente regulada; la expresión de su gen está inducida por una amplia gama de condiciones de estrés (estrés traumático, angiogénesis (desarrollo incontrolado de los vasos sanguíneos), hipoxia, hiperoxia, choque térmico, exposición a la luz ultravioleta, peróxido de hidrógeno y otras muchas agresiones metabólicas). La HO-2 se encuentra principalmente en el cerebro y en los testículos, tejidos en donde se expresa de manera continua. Finalmente, el tercer isozima, HO-3, todavía no está bien caracterizado. ■

Aminoácidos precursores de la creatina y del glutatión

La **fosfocreatina,** derivada de la **creatina,** constituye un importante amortiguador energético en el músculo esquelético (véase la Fig. 13–5). La creatina se sintetiza a partir de la glicina y la arginina **(Fig. 22–26)**; la metionina, en forma de *S*-adenosilmetionina, es el dador del grupo metilo.

El **glutatión (GSH),** presente en plantas, animales y en algunas bacterias, a menudo en altas concentraciones, puede ser considerado como un amortiguador de oxidación-reducción. Procede de la glicina, el glutamato y la cisteína **(Fig. 22–27)**. El grupo γ-carboxilo del glutamato se activa con ATP para formar un intermediario acil fosfato, que a continuación es atacado por

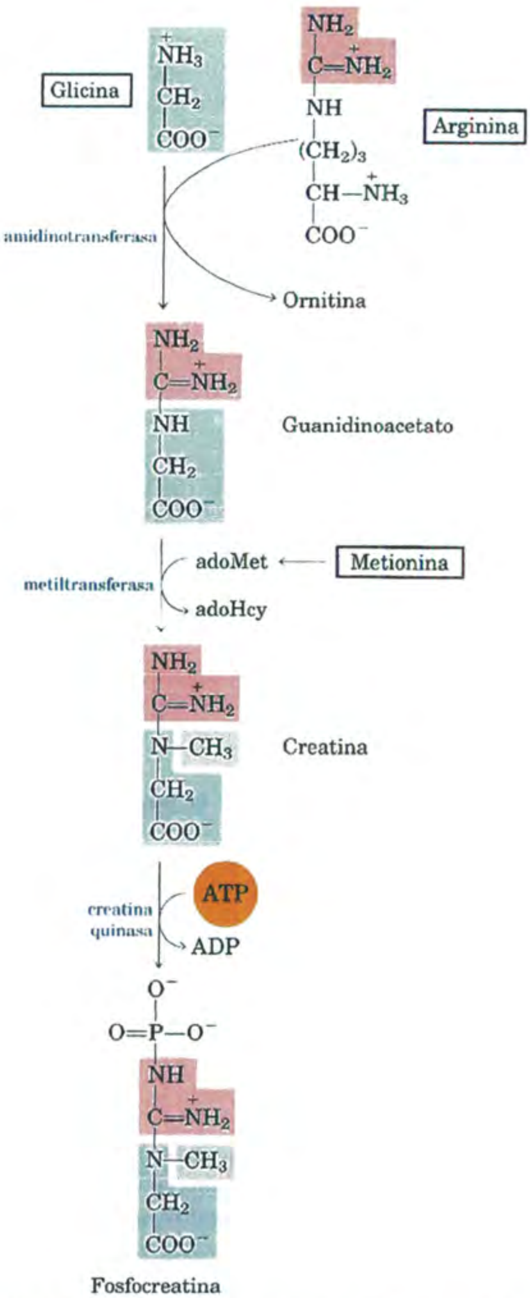


FIGURA 22–26 Biosíntesis de creatina y fosfocreatina. La creatina se forma a partir de tres aminoácidos: glicina, arginina y metionina. Esta vía muestra la versatilidad de los aminoácidos como precursores en la biosíntesis de otras biomoléculas nitrogenadas.

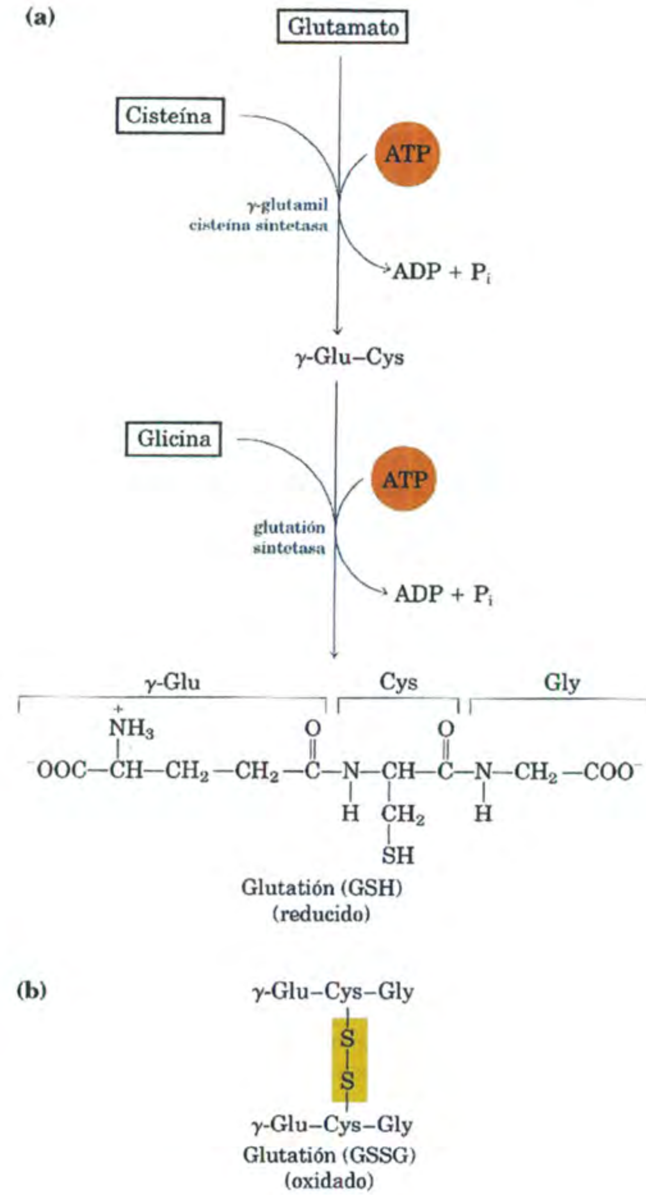


FIGURA 22–27 Metabolismo del glutatión. (a) Biosíntesis del glutatión. **(b)** Forma oxidada del glutatión.

el grupo α-amino de la cisteína. Sigue una segunda reacción de condensación, con el grupo α-carboxilo de la cisteína activado como acil fosfato para permitir la reacción con la glicina. La forma oxidada del glutatión (GSSG), producida en el transcurso de sus actividades redox, contiene dos moléculas de glutatión unidas mediante un puente disulfuro.

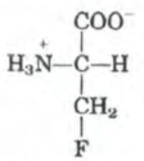
El glutatión probablemente ayuda a mantener los grupos sulfhidrilo de las proteínas en su forma reducida y el hierro del grupo hemo en estado ferroso (Fe^{2+}), y también actúa como agente reductor de la glutarredoxina en la síntesis de desoxirribonucleótidos (véase la Fig. 22–39). Su acción redox también se usa para la eliminación de los peróxidos tóxicos que se forman durante el crecimiento y en el metabolismo en condiciones aeróbicas:

$$2\,GSH + R{-}O{-}O{-}H \longrightarrow GSSG + H_2O + R{-}OH$$

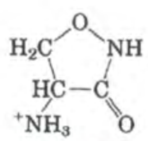
Esta reacción está catalizada por la **glutatión peroxidasa,** un enzima que tiene la peculiaridad de contener un átomo de selenio (Se), unido covalentemente en forma de selenocisteína (véase la Fig. 3–8a), que es esencial para su actividad.

Los D-aminoácidos se hallan fundamentalmente en las bacterias

Aunque los D-aminoácidos no se encuentran generalmente en las proteínas, estos tienen algunas funciones especiales en la estructura de las paredes celulares bacterianas y de los antibióticos peptídicos. Los peptidoglucanos de las bacterias (véase la Fig. 20–31) contienen D-alanina y D-glutamato. Los D-aminoácidos se forman directamente a partir de los isómeros L por acción de aminoácido racemasas, que utilizan piridoxal fosfato como cofactor (véase la Fig. 18–6). La racemización de los aminoácidos es un proceso importante solamente en el metabolismo bacteriano, por lo que enzimas tales como la alanina racemasa son objetivos fundamentales de agentes farmacológicos. Un agente de este tipo, la **L-fluoroalanina,** está siendo estudiado como fármaco bactericida. Otro compuesto, la **cicloserina,** se utiliza para tratar la tuberculosis. Puesto que estos inhibidores también afectan a algunos enzimas que precisan PLP en humanos, pueden presentar ciertos efectos secundarios indeseables. ■



L-Fluoroalanina



Cicloserina

Los aminoácidos aromáticos son precursores de muchos compuestos presentes en los vegetales

En las plantas, la fenilalanina, la tirosina y el triptófano se convierten en toda una serie de compuestos importantes. El polímero rígido **lignina** procede de la fenilalanina y de la tirosina. En los tejidos vegetales, sólo es superado en abundancia por la celulosa. La estructura del polímero lignina es compleja y no totalmente conocida.

El triptófano es también el precursor de la hormona de crecimiento vegetal indol-3-acetato, o **auxina (Fig. 22–28a)**, que ha sido relacionada con la regulación de una amplia gama de procesos biológicos en las plantas.

La fenilalanina y la tirosina dan lugar también a toda una gama de productos naturales comerciales importantes, tales como taninos, que inhiben la oxidación del vino; alcaloides tales como la morfina, que tienen potentes efectos fisiológicos, y los sabores de la esencia de canela (Fig. 22–28b), la nuez moscada, el clavo, la vainilla, la pimienta y otros productos.

Las aminas biógenas son productos de descarboxilación de los aminoácidos

Muchos neurotransmisores importantes son aminas primarias o secundarias que se forman a partir de aminoácidos mediante rutas sencillas. Además, algunas poliaminas que forman complejos con el DNA proceden del aminoácido ornitina, un componente del ciclo de la urea. Un denominador común de muchas de estas vías es la descarboxilación de los aminoácidos, otra reacción que requiere PLP (véase la Fig. 18–6).

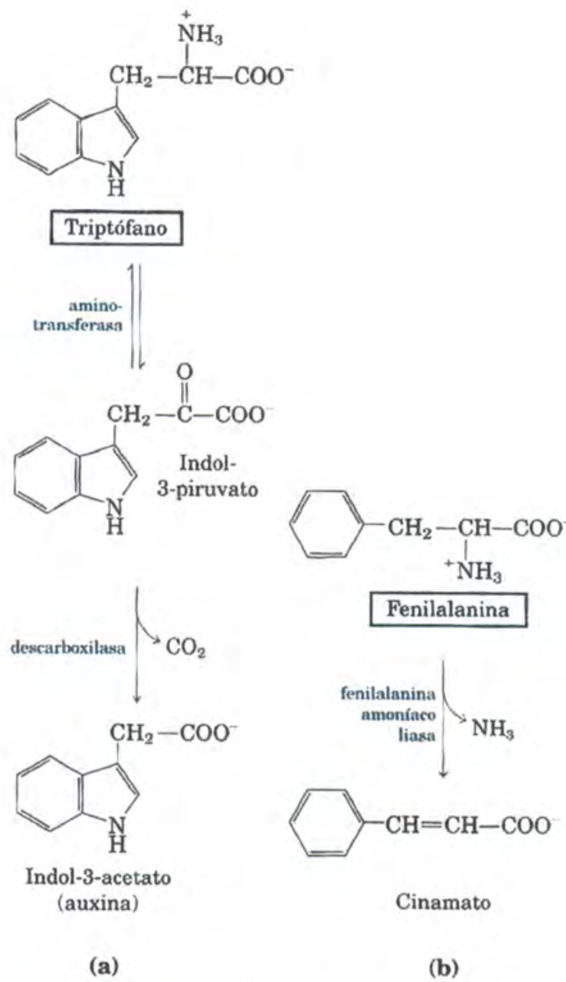


FIGURA 22–28 Biosíntesis de dos sustancias vegetales a partir de aminoácidos. (a) Indol-3-acetato (auxina) y (b) cinamato (esencia de canela).

La síntesis de algunos neurotransmisores se muestra en la **Figura 22–29**. La tirosina da lugar a una familia de catecolaminas, que incluye la **dopamina,** la **noradrenalina** y la **adrenalina.** Los niveles de catecolaminas están relacionados (entre otros aspectos) con los cambios de presión sanguínea. La enfermedad neurológica de Parkinson está relacionada con una producción insuficiente de dopamina, y ha sido tratada tradicionalmente con administración de L-dopa. La sobreproducción de dopamina en el cerebro se ha relacionado con alteraciones psíquicas tales como la esquizofrenia.

La descarboxilación del glutamato da lugar al **γ-aminobutirato (GABA),** un neurotransmisor inhibitorio. Su deficiencia está relacionada con los ataques epilépticos. Se utilizan análogos del GABA para el tratamiento de la epilepsia y de la hipertensión. Los niveles de GABA también pueden ser incrementados administrando inhibidores del enzima encargado de su degradación, la GABA aminotransferasa. Otro neurotransmisor importante, la **serotonina,** se forma en dos pasos a partir del triptófano.

La histidina se descarboxila para dar lugar a la **histamina,** un potente vasodilatador presente en los tejidos animales. La liberación de histamina en grandes cantidades forma parte de la respuesta alérgica. La histamina estimula también la secreción

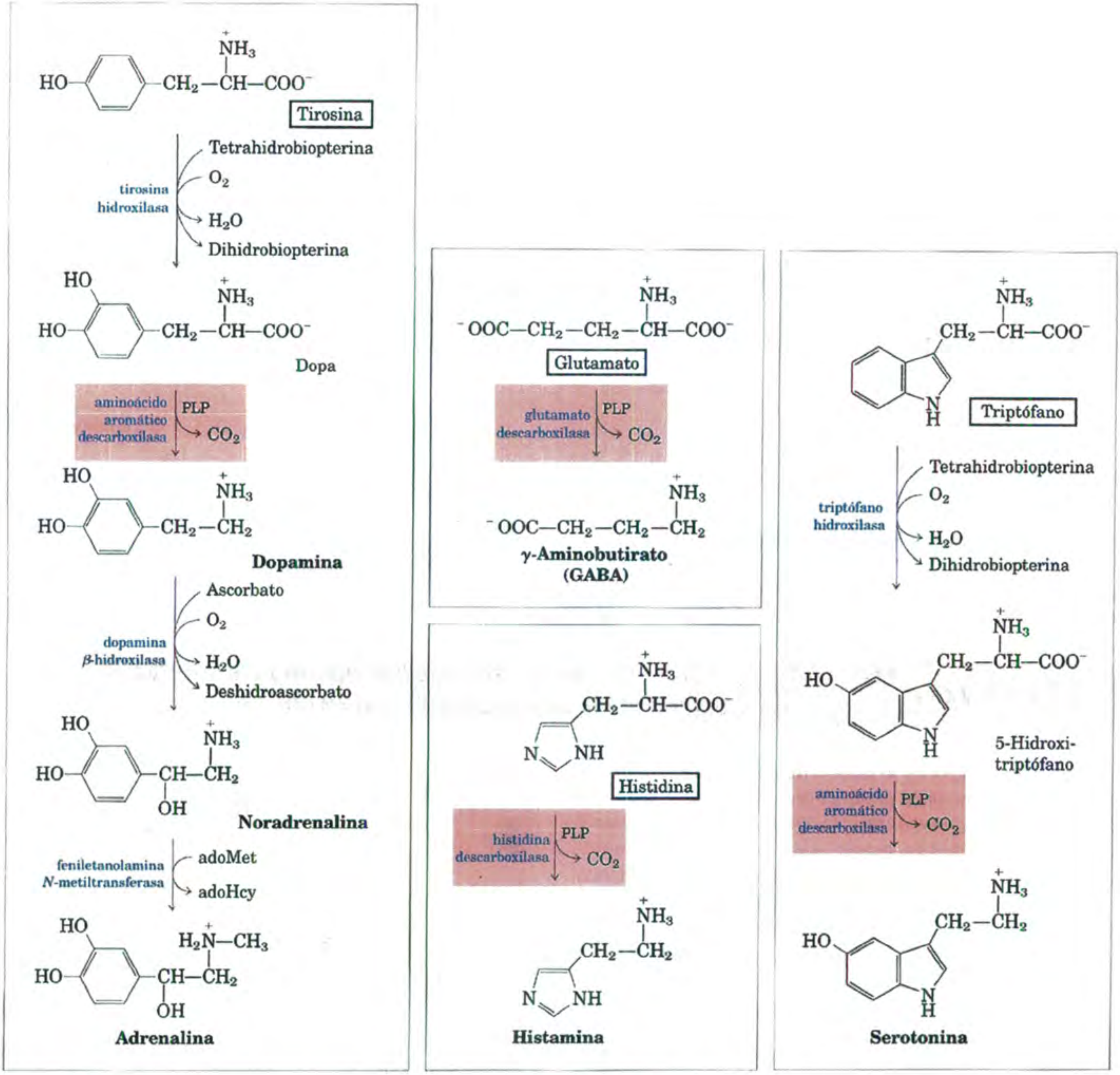
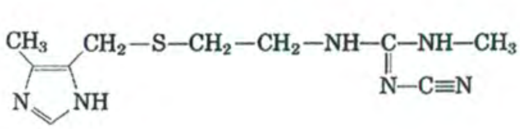


FIGURA 22–29 Biosíntesis de algunos neurotransmisores a partir de aminoácidos. El paso clave es el mismo en todos los casos: una descarboxilación dependiente de PLP (coloreado en rosa).

ácida del estómago. Existe una gran variedad de compuestos farmacológicos diseñados para interferir con la síntesis o con la acción de la histamina. Un ejemplo destacable es un antagonista del receptor de histamina, la **cimetidina** (Tagamet), análogo estructural de la histamina:



Favorece la curación de las úlceras duodenales al inhibir la secreción de ácido gástrico.

Las poliaminas, tales como la **espermina** y la **espermidina,** que tienen un papel en el empaquetamiento del DNA, proceden de la metionina y de la ornitina por la vía que se muestra en la **Figura 22–30**. El primer paso es la descarboxilación de la ornitina, precursor de la arginina (Fig. 22–10). La **ornitina descarboxilasa,** un enzima que precisa PLP, es la diana de varios inhibidores potentes usados como agentes farmacológicos (Recuadro 22–3). ■

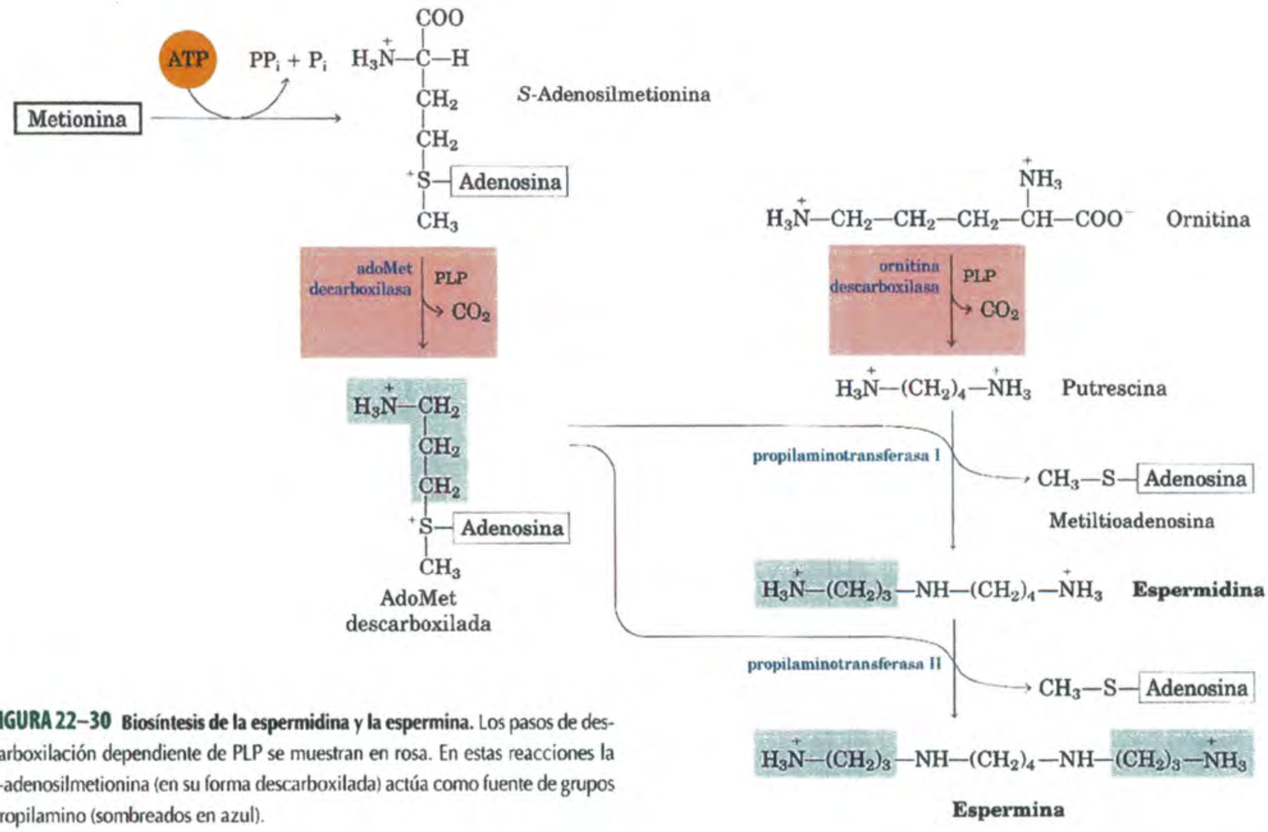


FIGURA 22–30 Biosíntesis de la espermidina y la espermina. Los pasos de descarboxilación dependiente de PLP se muestran en rosa. En estas reacciones la *S*-adenosilmetionina (en su forma descarboxilada) actúa como fuente de grupos propilamino (sombreados en azul).

RECUADRO 22–3 MEDICINA Un caballo de Troya bioquímico para la curación de la enfermedad del sueño africana

La enfermedad del sueño africana, o tripanosomiasis africana, está provocada por unos protistas (eucariotas unicelulares) denominados tripanosomas (Fig. 1). Esta enfermedad (y otras relacionadas con el tripanosoma) causa un gran impacto médico y económico en muchos países en desarrollo. Hasta finales del siglo XX esta enfermedad era prácticamente incurable. Las vacunas no son eficaces, puesto que este parásito posee un mecanismo, hasta hace poco no descrito, que le permite eludir el sistema inmunitario del huésped.

La cubierta celular de los tripanosomas está revestida de una sola proteína que es el antígeno al que responde el sistema inmunitario. Sin embargo, de vez en cuando, por un proceso de recombinación génica (véase la Tabla 28–1), unas cuantas células de la población infectante de tripanosomas la modifican a una nueva proteína de la cubierta, de forma que deja de ser reconocida por el sistema inmunológico. Este proceso de "cambio de la cubierta" puede tener lugar centenares de veces. El resultado es una infección crónica cíclica: el paciente tiene fiebre, que remite cuando el sistema inmunológico vence la primera infección; los tripanosomas que han modificado su envoltura actúan de germen para una segunda infección, de manera que la fiebre vuelve a aparecer. Este ciclo puede repetirse durante semanas, hasta que el paciente, extremamente debilitado, muere.

Algunos procedimientos modernos para tratar la enfermedad del sueño africana se basan en los conocimientos de enzimología y metabolismo. En al menos uno de estos enfoques se utilizan compuestos farmacológicos diseñados para actuar como

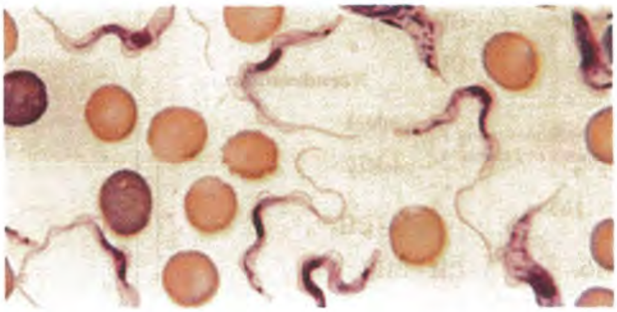


FIGURA 1 *Trypanosoma brucei rhodesiense*, uno de los agentes causales de la enfermedad del sueño africana.

inactivadores del mecanismo enzimático (inhibidores suicidas; p. 204). Un punto vulnerable en el metabolismo de los tripanosomas es la ruta de biosíntesis de poliaminas. Las poliaminas espermina y espermidina, implicadas en el empaquetamiento del DNA, se necesitan en grandes cantidades en las células en rápida división. El primer paso de su síntesis está catalizado por la ornitina descarboxilasa, un enzima que precisa PLP (véase la Fig. 22–30). En las células de los mamíferos, la ornitina descarboxilasa tiene un recambio rápido, es decir, se degrada y se sintetiza rápida y continuamente. Sin embargo, por razones no comprendidas del todo, el enzima de algunos tripanosomas es estable y no es rápidamente reemplazado por enzima de nueva síntesis. Un inhibidor de la ornitina descarboxilasa que se uniera

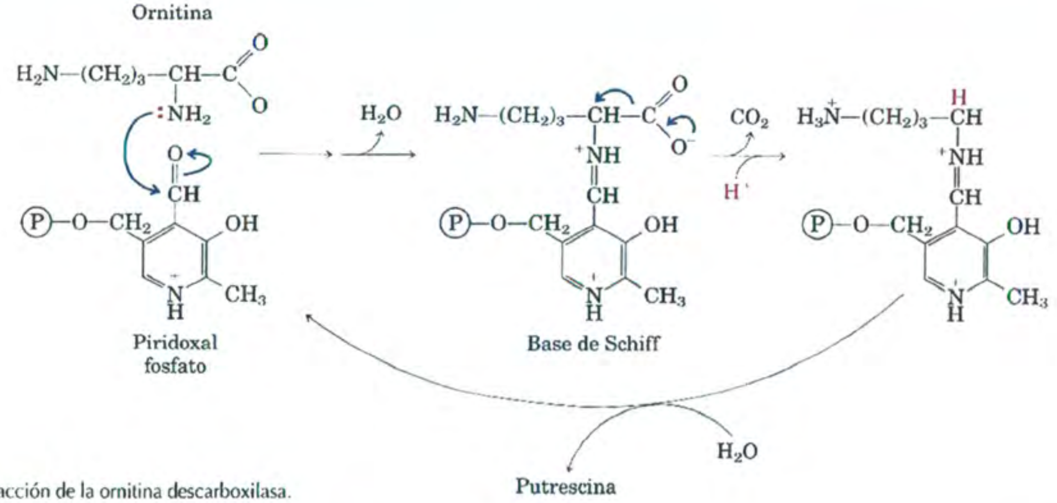


FIGURA 2 Mecanismo de reacción de la ornitina descarboxilasa.

de forma permanente al enzima tendría pues poco efecto sobre las células de los mamíferos, que podrían reemplazar rápidamente el enzima inactivado, pero afectaría adversamente al parásito.

Los primeros pasos de la reacción normal catalizada por la ornitina descarboxilasa se muestran en la Figura 2. Una vez liberado el CO_2, el desplazamiento de los electrones se invierte y se forma putrescina (véase la Fig. 22–30). Se han diseñado diferentes inhibidores suicidas para este enzima basados en este mecanismo, entre ellos la difluorometilornitina (DFMO). La DFMO es relativamente inerte en disolución. Sin embargo, cuando se une a la ornitina descarboxilasa el enzima se inactiva rápidamente (Fig. 3). Este inhibidor constituye un sumidero de electrones alternativo debido a sus dos átomos de flúor colocados estratégicamente, que son excelentes grupos salientes. En lugar de que los electrones entren en la estructura anular del PLP, la reacción provoca el desplazamiento de un átomo de flúor. El S de un residuo Cys en el sitio activo del enzima forma entonces un complejo covalente con el aducto PLP-inhibidor altamente reactivo en una reacción que es esencialmente irreversible. De esta forma el inhibidor utiliza los mecanismos de reacción propios del enzima para inactivarlo.

La DFMO ha resultado muy efectiva contra la enfermedad del sueño africana en pruebas clínicas, y en la actualidad se utiliza para tratar la enfermedad del sueño africana producida por *Trypanosoma brucei gambiense*. Enfoques como éste ofrecen grandes expectativas de poder tratar una amplia gama de enfermedades. El diseño de fármacos basado en los mecanismos enzimáticos y en la estructura pueden complementar los procedimientos más tradicionales de prueba y error para desarrollar nuevos fármacos.

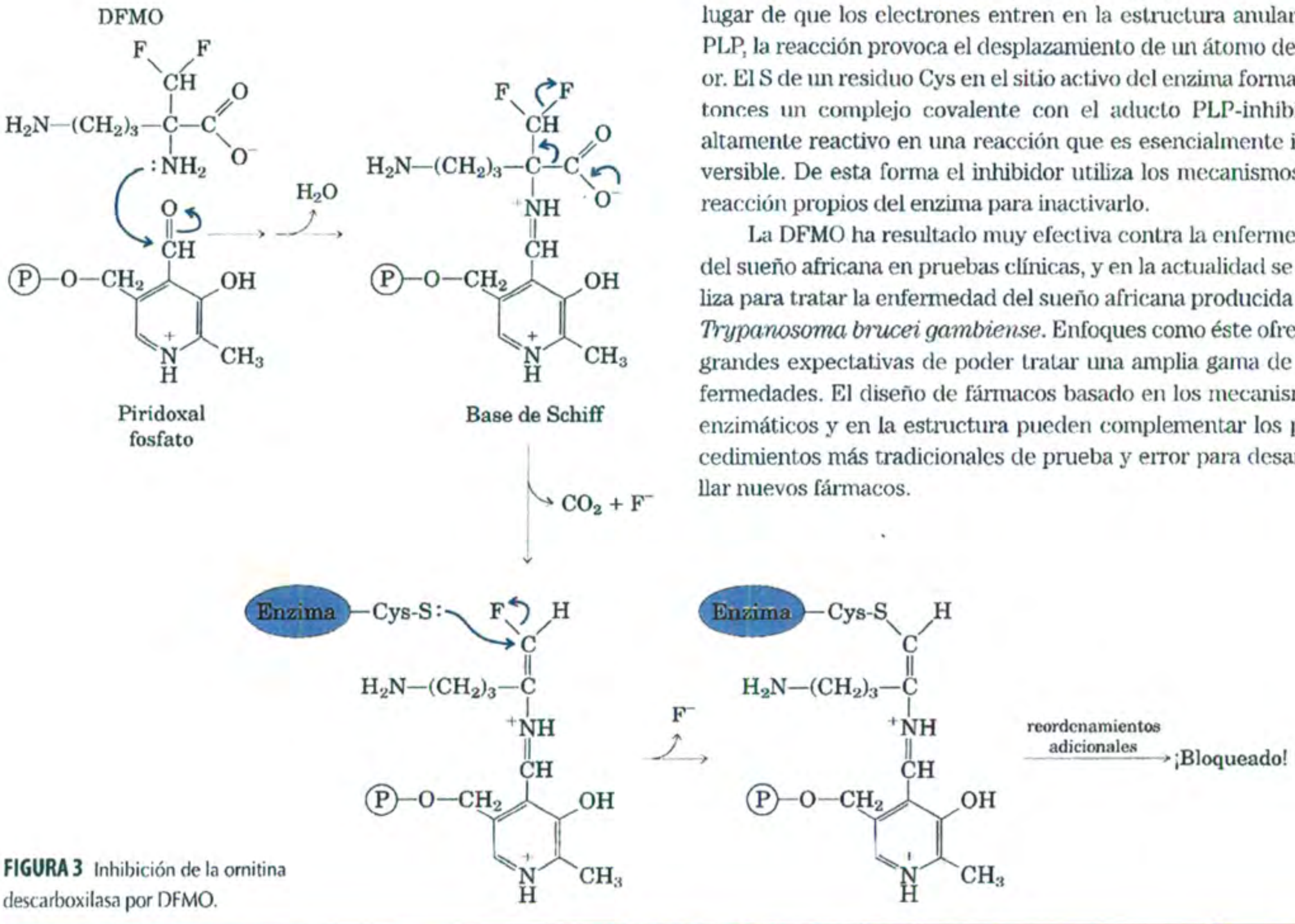


FIGURA 3 Inhibición de la ornitina descarboxilasa por DFMO.

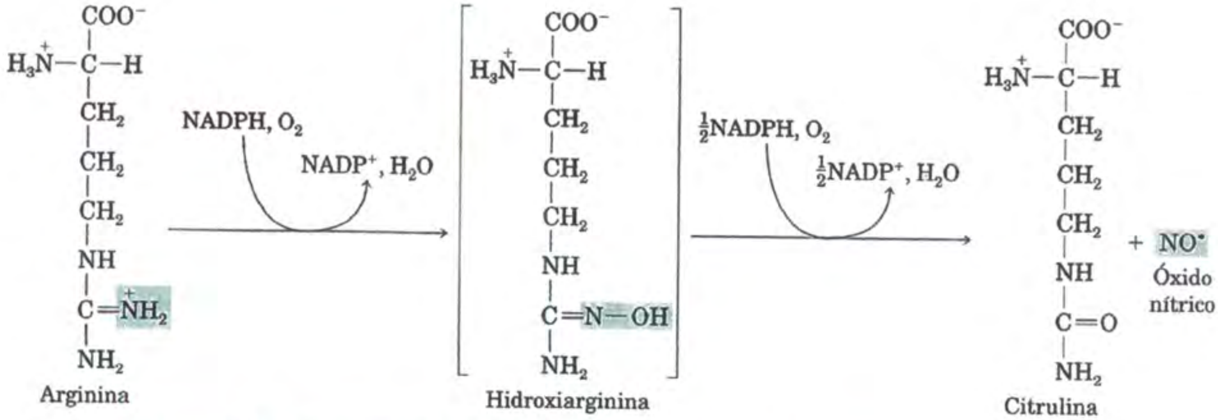


FIGURA 22–31 Biosíntesis del óxido nítrico. Ambos pasos están catalizados por la óxido nítrico sintasa. El nitrógeno del NO procede del grupo guanidinio de la arginina.

La arginina es el precursor de la síntesis biológica del óxido nítrico

Un hallazgo sorprendente a mediados de la década de 1980 fue el papel del óxido nítrico (NO), antes conocido principalmente como contaminante atmosférico, como un importante mensajero biológico. Esta sencilla sustancia gaseosa se difunde fácilmente a través de las membranas, aunque su elevada reactividad limita su difusión a un radio de aproximadamente 1 mm desde el sitio de síntesis. En los humanos, el NO participa en una amplia gama de procesos fisiológicos, entre los que se incluyen la neurotransmisión, la coagulación sanguínea y el control de la presión sanguínea. Su modo de acción se describe en el Capítulo 12 (p. 446).

El óxido nítrico se sintetiza a partir de arginina en una reacción dependiente de NADPH, catalizada por la óxido nítrico sintasa **(Fig. 22–31)**, un enzima dimérico estructuralmente relacionado con la NADPH citocromo P-450 reductasa (véase el Recuadro 21–1). La reacción es una oxidación de cinco electrones. Cada subunidad del enzima lleva unida una molécula de cada uno de estos cuatro diferentes cofactores: FMN, FAD, tetrahidrobiopterina y hemo Fe^{3+}. El NO es una molécula inestable y no puede ser almacenada. Su síntesis es estimulada por la interacción de la óxido nítrico sintasa con la calmodulina-Ca^{2+} (véase la Fig. 12–11).

RESUMEN 22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos

- Muchas biomoléculas importantes son derivados de aminoácidos. La glicina es un precursor de las porfirinas. La degradación de la ferroporfirina (hemo) genera bilirrubina, que se convierte en pigmentos biliares que tienen diversas funciones fisiológicas.
- La glicina y la arginina producen creatina y fosfocreatina, que es un amortiguador energético. El glutatión, formado a partir de tres aminoácidos, es un agente reductor celular importante.
- Las bacterias sintetizan D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos mediante reacciones de racemización que requieren piridoxal fosfato. Los D-aminoácidos se encuentran frecuentemente en ciertas paredes bacterianas y ciertos antibióticos.
- Los aminoácidos aromáticos dan lugar a muchas sustancias vegetales. La descarboxilación dependiente de PLP de algunos aminoácidos produce aminas biógenas importantes, incluidos neurotransmisores.
- La arginina es el precursor del óxido nítrico, un mensajero biológico.

22.4 Biosíntesis y degradación de los nucleótidos

Tal como se comentó en el Capítulo 8, los nucleótidos tienen una amplia variedad de funciones en todas las células. Son los precursores del DNA y del RNA. El ATP, y en cierta medida el GTP, son los principales transportadores de la energía química. Son componentes de los cofactores NAD, FAD, *S*-adenosilmetionina y coenzima A, así como de intermediarios biosintéticos activados tales como la UDP-glucosa y el CDP-diacilglicerol. Algunos nucleótidos, tales como el cAMP y el cGMP, actúan también como segundos mensajeros celulares.

Hay dos tipos de rutas metabólicas que conducen a la formación de los nucleótidos: las **rutas de novo** y las **rutas de recuperación.** La síntesis de novo de los nucleótidos empieza a partir de sus precursores metabólicos: aminoácidos, ribosa 5-fosfato, CO_2 y NH_3. Las rutas de recuperación reciclan las bases libres y los nucleósidos liberados de la degradación de los ácidos nucleicos. Ambos tipos de rutas son importantes en el metabolismo celular y ambos se discuten en esta sección.

Las rutas de novo para la biosíntesis de purinas y pirimidinas son idénticas en prácticamente todos los seres vivos. Es de destacar que las bases libres guanina, adenina, timina, citidina y uracilo *no* son intermediarios en estas vías; es decir, no se sintetizan las bases y a continuación se unen a la ribosa como podría esperarse. La estructura del anillo de purina se construye añadiendo uno o unos pocos átomos a la vez a la ribosa a lo largo de todo el proceso. El anillo de pirimidina se sintetiza como **orotato,** unido a ribosa fosfato, y a continuación se convierte

en los nucleótidos de pirimidina comunes que se utilizan en la síntesis de los ácidos nucleicos. Aunque las bases libres no son intermediarios en las rutas de síntesis de novo, pueden serlo en algunas vías de recuperación.

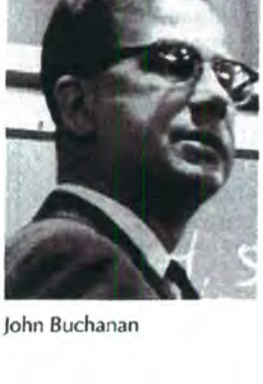
Las rutas de síntesis de novo de purinas y de pirimidinas comparten varios precursores importantes. El fosforribosil pirofosfato (PRPP) es importante en ambos casos, y en estas vías la estructura de la ribosa se mantiene en el nucleótido sintetizado, a diferencia de lo descrito anteriormente en el caso de la síntesis del triptófano y de la histidina. En cada ruta un aminoácido es un precursor importante: la glicina para las purinas y el aspartato para las pirimidinas. Una vez más, la glutamina es la fuente más importante de grupos amino, jugando este papel en cinco pasos distintos de la vía de novo. El aspartato también se utiliza dos veces como fuente de un grupo amino en las rutas de las purinas.

Otros dos aspectos merecen ser mencionados. En primer lugar, hay pruebas, sobre todo en la ruta de novo de las purinas, de que en la célula los enzimas implicados forman parte de grandes complejos multienzimáticos, un tema recurrente en el metabolismo. En segundo lugar, las reservas celulares de nucleótidos (a excepción del ATP) son bastante pequeñas, tal vez un 1% o menos de las cantidades necesarias para sintetizar el DNA celular. Por ello, las células han de continuar sintetizando nucleótidos durante la síntesis de los ácidos nucleicos, y en algunos casos la síntesis de nucleótidos puede ser un factor limitante de las velocidades de replicación y de transcripción del DNA. Debido a la gran importancia de estos procesos en las células en división, los agentes inhibidores de la síntesis de nucleótidos han adquirido una gran importancia en la medicina moderna.

Examinaremos a continuación las rutas biosintéticas de los nucleótidos de purinas y pirimidinas, así como su regulación, la síntesis de desoxinucleótidos y la degradación de purinas y pirimidinas hasta ácido úrico y urea. Finalizaremos con una discusión de los agentes quimioterápicos que afectan a la síntesis de nucleótidos.

La síntesis de novo de los nucleótidos de purina empieza con el PRPP

Los dos nucleótidos de purina originales de los ácidos nucleicos son la adenosina 5'-monofosfato (AMP; adenilato) y la guanosina 5'-monofosfato (GMP; guanilato), que contienen las bases púricas adenina y guanina. La **Figura 22–32** muestra el origen de los átomos de carbono y de nitrógeno del sistema de anillos de la purina, tal como fue descrito por John Buchanan mediante el uso de marcadores isotópicos en aves. La ruta de biosíntesis de las purinas fue descrita en detalle por primera vez por Buchanan y G. Robert Greenberg en la década de 1950.



John Buchanan

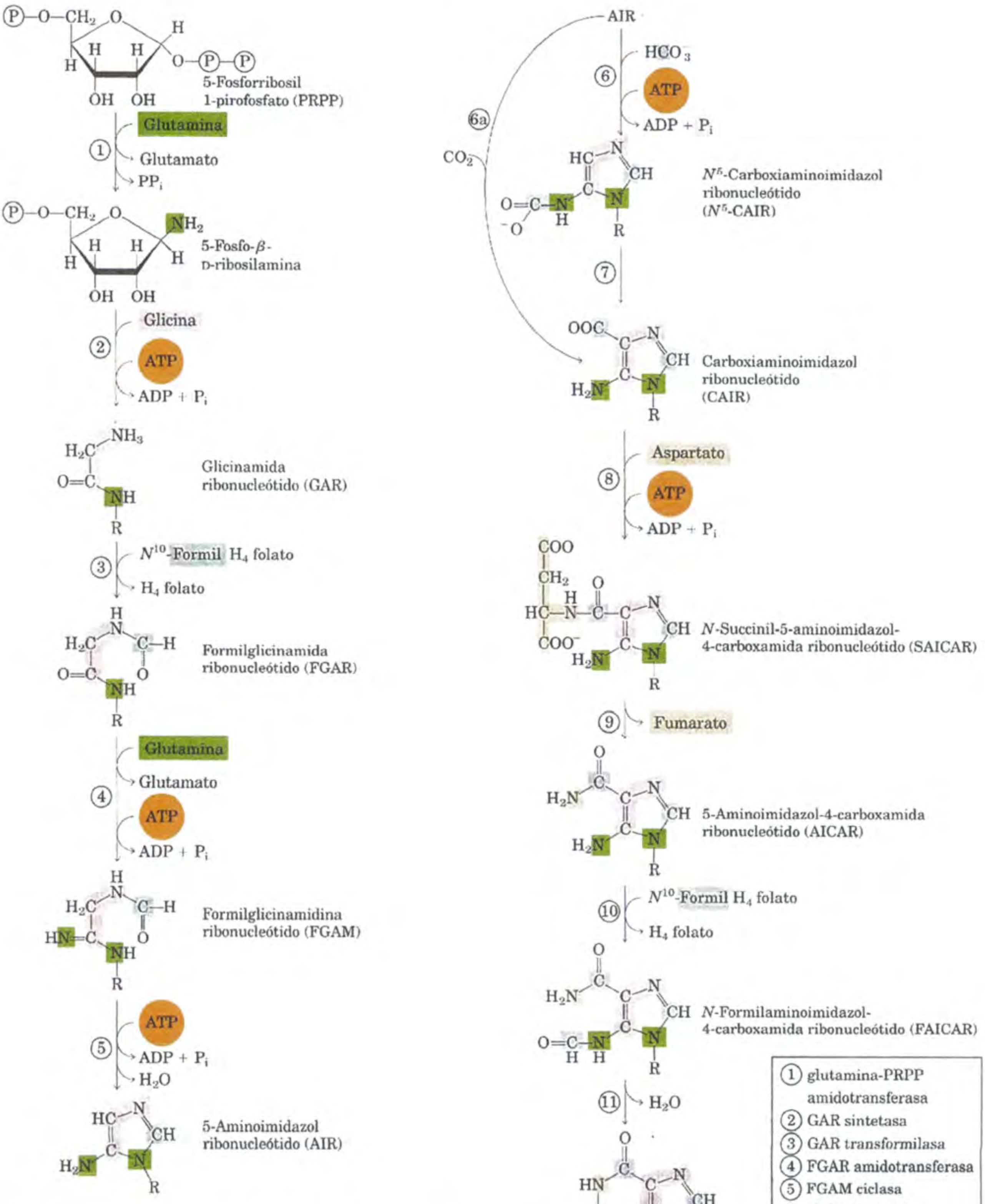
En el primer paso determinante de la ruta, un grupo amino, proporcionado por la glutamina, se une al C-1 del PRPP **(Fig. 22–33)**. La **5-fosforribosilamina** resultante es muy inestable, con una vida media de 30 segundos a pH 7,5. El anillo de purina se construye a continuación sobre esta estructura. La ruta aquí descrita es idéntica en todos los organismos, con la excepción de un paso que, tal como se menciona más adelante, es diferente en los eucariotas superiores.

FIGURA 22–32 Origen de los átomos del anillo de las purinas. Esta información fue obtenida a partir de experimentos de marcaje isotópico con precursores marcados con ^{14}C o ^{15}N. El formato es suministrado en forma de N^{10}-formiltetrahidrofolato.

El segundo paso consiste en la incorporación de tres átomos de la glicina (Fig. 22–33, paso ②). Se gasta un ATP para activar el grupo carboxilo de la glicina (en forma de acil fosfato) para esta reacción de condensación. El grupo amino de la glicina incorporada se formila a continuación por acción del N^{10}-formiltetrahidrofolato (paso ③), y se incorpora un nitrógeno suministrado por la glutamina (paso ④), antes que la deshidratación y el cierre del anillo den lugar al anillo de imidazol de cinco átomos del núcleo de la purina, en forma de 5-aminoimidazol ribonucleótido (AIR; paso ⑤).

En este punto, tres de los seis átomos necesarios para la formación del segundo anillo de purina se encuentran en la posición que les corresponde. Para completar el proceso se añade primero un grupo carboxilo (paso ⑥). Se trata de una carboxilación poco habitual, puesto que no utiliza biotina, sino que se realiza a partir del bicarbonato que se halla normalmente en las disoluciones acuosas. Una reorganización transfiere el carboxilato del grupo amino exocíclico a la posición 4 del anillo de imidazol (paso ⑦). Los pasos ⑥ y ⑦ sólo se encuentran en bacterias y hongos. En los eucariotas superiores, incluidos los humanos, el 5-aminoimidazol ribonucleótido, producto del paso ⑤ es carboxilado directamente a carboxiaminoimidazol ribonucleótido en un solo paso en lugar de dos (paso 6a). El enzima que cataliza esta reacción es la AIR carboxilasa.

A continuación, el aspartato cede su grupo amino en dos pasos (⑧ y ⑨): formación de un enlace amida seguido de la eliminación del esqueleto carbonado del aspartato (en forma de fumarato). (Recuerde que el aspartato tiene un papel análogo en dos pasos del ciclo de la urea; véase la Fig. 18–10.) El último átomo de carbono es proporcionado por el N^{10}-formiltetrahidrofolato (paso ⑩), y a continuación tiene lugar la segunda ciclación que proporciona el segundo de los dos anillos adyacentes del núcleo de purina (paso ⑪). El primer intermediario con un anillo purínico completo es el **inosinato (IMP)**.



1. glutamina-PRPP amidotransferasa
2. GAR sintetasa
3. GAR transformilasa
4. FGAR amidotransferasa
5. FGAM ciclasa (AIR sintetasa)
6. N^5-CAIR sintetasa
6a. AIR carboxilasa
7. N^5-CAIR mutasa
8. SAICAR sintetasa
9. SAICAR liasa
10. AICAR transformilasa
11. IMP sintasa

FIGURA 22–33 Síntesis de novo de los nucleótidos de purina: construcción del anillo purínico del inosinato (IMP). Cada incorporación al anillo purínico está coloreada de la misma forma que en la Fig. 22–32. A partir del paso (2), R simboliza el grupo 5-fosfo-D-ribosilo sobre el cual se construye el anillo purínico. La formación de 5-fosforribosilamina (paso (1)) es el primer paso determinante de la síntesis de las purinas. Observe que el producto del paso (9), AICAR, es el remanente del ATP liberado durante la biosíntesis de histidina (véase la Fig. 22–20, paso (5)). Se utilizan abreviaturas para la mayor parte de los intermediarios para simplificar la nomenclatura de los enzimas de la vía. El paso (6a) es la ruta alternativa de AIR a CAIR que se da en los eucariotas superiores.

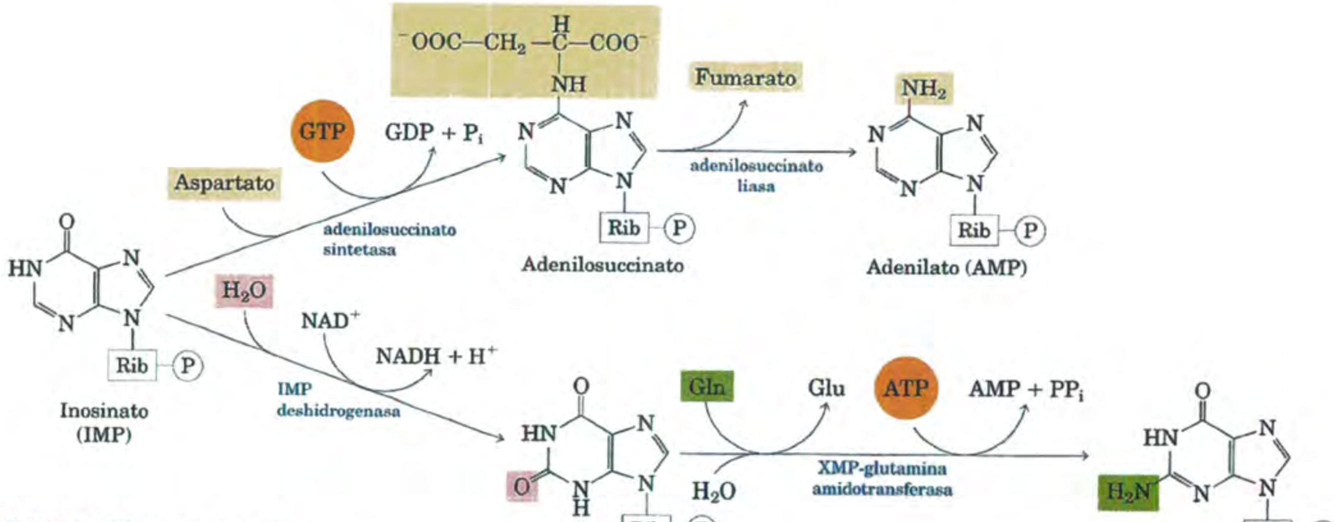


FIGURA 22–34 Biosíntesis de AMP y GMP a partir de IMP.

Del mismo modo que en las rutas biosintéticas del triptófano y la histidina, los enzimas de la síntesis del IMP parece que forman parte de grandes complejos multienzimáticos celulares. Prueba de ello, una vez más, es la existencia de polipéptidos con varias funciones en una única cadena, algunos de los cuales catalizan pasos no secuenciales de la ruta. En las células eucarióticas, desde las levaduras hasta la mosca del vinagre o el pollo, los pasos ①, ③ y ⑤ de la Figura 22–33 están catalizados por una proteína multifuncional. Otra proteína multifuncional cataliza los pasos ⑩ y ⑪. En los humanos, un enzima multifuncional combina las actividades de la AIR carboxilasa y la SAICAR sintetasa (pasos ⑥a y ⑧). En las bacterias estas actividades se encuentran en proteínas separadas, pero las proteínas podrían formar un gran complejo no covalente. La canalización de los intermediarios de reacción desde un enzima hasta el siguiente, favorecida por estos complejos, es probablemente muy importante en el caso de intermediarios poco estables tales como la 5-fosforribosilamina.

La conversión del inosinato en adenilato requiere la incorporación de un grupo amino que procede del aspartato **(Fig. 22–34)**; esta incorporación tiene lugar en dos reacciones similares a las utilizadas para incorporar el N-1 del anillo de la purina (Fig. 22–33, pasos ⑧ y ⑨). Una diferencia clave consiste en la utilización de GTP, en lugar de ATP, como fuente de energía en la síntesis del adenilosuccinato. El guanilato se forma por oxidación del inosinato en C-2, que requiere NAD^+, reacción seguida por la incorporación de un grupo amino procedente de la glutamina. El ATP se hidroliza a AMP y PP_i en el último paso (Fig. 22–34).

La biosíntesis de los nucleótidos de purina está regulada por retroinhibición

Tres mecanismos principales de retroalimentación cooperan en la regulación de la velocidad global de síntesis de novo de los nucleótidos purínicos y de las velocidades relativas de formación de los dos productos finales, adenilato y guanilato **(Fig. 22–35)**. El primero de estos mecanismos se ejerce sobre

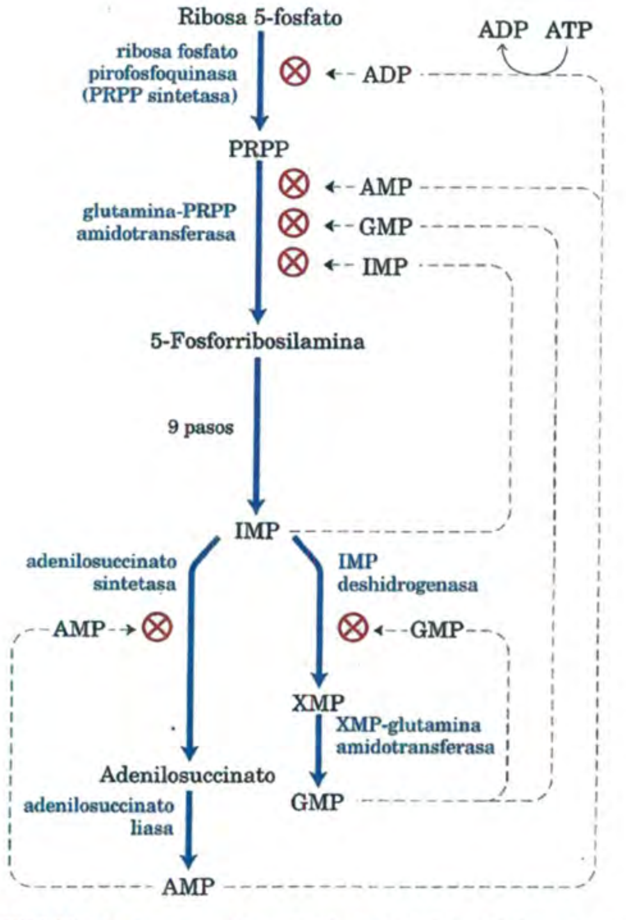


FIGURA 22–35 Mecanismos de regulación de la biosíntesis de los nucleótidos de adenina y de guanina en *E. coli*. La regulación de estas rutas es distinta en otros organismos.

la primera reacción específica de la síntesis de purinas: la transferencia de un grupo amino al PRPP para formar la 5-fosforribosilamina. Esta reacción está catalizada por el enzima alostérico glutamina-PRPP amidotransferasa, que es inhibido por los productos finales IMP, AMP y GMP. El AMP y el GMP actúan de manera sinérgica en esta inhibición concertada. Así pues, siempre que el AMP o el GMP se acumulan en exceso, se inhibe parcialmente el primer paso de su biosíntesis a partir de PRPP.

En el segundo mecanismo de control, que se ejerce más adelante, un exceso de GMP en la célula inhibe la formación de xantilato a partir de inosinato, catalizada por la IMP deshidrogenasa, sin afectar la formación de AMP (Fig. 22–35). Por el contrario, una acumulación de adenilato inhibe la formación de adenilosuccinato por la adenilosuccinato sintetasa, sin que se vea afectada la biosíntesis de GMP. En el tercer mecanismo, el GTP es necesario para la conversión de IMP en AMP, mientras que el ATP es necesario para la conversión de IMP en GMP (Fig. 22–34), un control recíproco que tiende a equilibrar la síntesis de los dos ribonucleótidos.

El mecanismo de control final es la inhibición de la síntesis de PRPP por regulación alostérica de la ribosa fosfato pirofosfoquinasa. Este enzima es inhibido por ADP y GDP y por los metabolitos de otras rutas en las que el PRPP es el punto de inicio.

Los nucleótidos de pirimidina se sintetizan a partir de aspartarto, PRPP y carbamil fosfato

Los ribonucleótidos comunes de pirimidina son la citidina 5′-monofosfato (CMP; citidilato) y la uridina 5′-monofosfato (UMP; uridilato), que contienen las pirimidinas citosina y uracilo. La biosíntesis de novo de los nucleótidos de pirimidina **(Fig. 22–36)** difiere en cierta medida de la síntesis de nucleótidos de purina, puesto que el anillo de seis átomos de la pirimidina se sintetiza primero, y a continuación se une a la ribosa 5-fosfato. Este proceso necesita carbamil fosfato, también un intermediario del ciclo de la urea (véase la Fig. 18–10). Sin embargo, tal como mencionó en el Capítulo 18, en los animales el carbamil fosfato necesario para la síntesis de urea se forma en la mitocondria por acción de la carbamil fosfato sintetasa I, mientras que el carbamil fosfato necesario en la biosíntesis de pirimidinas se forma en el citosol por una forma distinta del enzima, la **carbamil fosfato sintetasa II.**

En las bacterias, un único enzima suministra el carbamil fosfato necesario para la síntesis de arginina y de pirimidinas. El enzima bacteriano tiene tres sitios activos separados, espaciados a lo largo de un canal de cerca de 100 Å de longitud **(Fig. 22–37)**. La carbamil fosfato sintetasa bacteriana es un buen ejemplo de canalización de intermediarios de reacción inestables entre sitios activos.

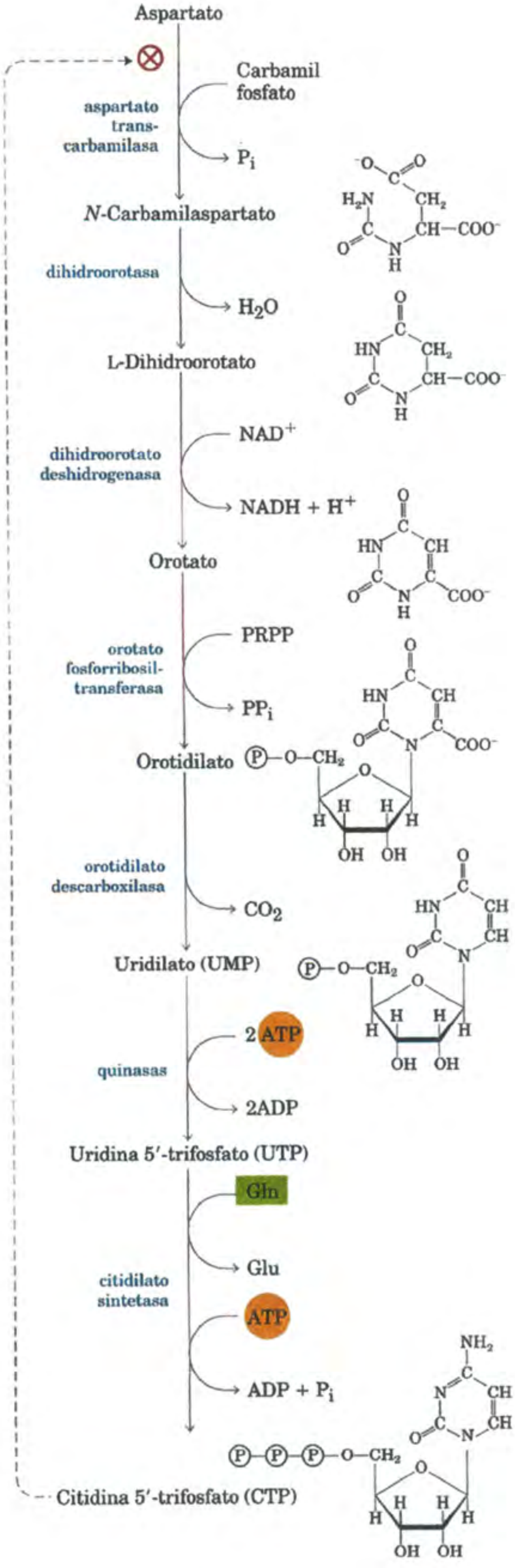


FIGURA 22–36 Síntesis de novo de los nucleótidos de pirimidina: biosíntesis de UTP y CTP por la vía del orotidilato. La pirimidina se construye a partir de carbamil fosfato y aspartato. La ribosa 5-fosfato se añade a continuación al anillo ya completo de pirimidina por la orotato fosforribosiltransferasa. El primer paso de la vía (no mostrado aquí; véase la Fig. 18–11a) es la síntesis de carbamil fosfato a partir de CO_2 y NH_4^+, catalizada en los eucariotas por la carbamil fosfato sintetasa II.

FIGURA 22–37 Canalización de intermediarios en la carbamil fosfato sintetasa bacteriana. (De PDB ID 1M6V). La reacción catalizada por este enzima se ilustra en la Figura 18–11a. Las subunidades grandes y pequeñas se muestran en azul y gris, respectivamente; el canal entre sitios activos (de casi 100 Å de longitud) se muestra como una trama amarilla. Una molécula de glutamina (verde) se une a la subunidad pequeña y cede su nitrógeno amídico como NH_4^+, en una reacción del tipo de la glutamina amidotransferasa. El NH_4^+ entra en el canal que lo conduce hasta un segundo sitio activo, donde se combina con bicarbonato en una reacción que requiere ATP (el ADP se muestra en azul). El carbamato vuelve a entrar a continuación en el canal para alcanzar el tercer sitio activo, donde es fosforilado a carbamil fosfato (el ADP unido se muestra en rojo).

El carbamil fosfato reacciona con el aspartato para dar *N*-carbamilaspartato en el primer paso determinante de la síntesis de las pirimidinas (Fig. 22–36). Esta reacción está catalizada por la **aspartato transcarbamilasa.** En las bacterias este paso está estrictamente regulado, y la aspartato transcarbamilasa bacteriana es uno de los enzimas alostéricos más estudiados (véase más adelante). El anillo de pirimidina se cierra por eliminación de una molécula de agua del *N*-carbamilaspartato, en una reacción catalizada por la **dihidroorotasa,** para dar L-dihidroorotato. Este compuesto se oxida para dar el derivado pirimidínico orotato, reacción en la que el NAD^+ es el aceptor final de electrones.

En los eucariotas, los tres primeros enzimas de esta vía (la carbamil fosfato sintetasa II, la aspartato transcarbamilasa y la dihidroorotasa) forman parte de una única proteína trifuncional. La proteína, conocida por las siglas CAD, está formada por tres cadenas polipeptídicas idénticas (cada una de M_r 230.000), con los sitios activos para las tres reacciones en cada subunidad. Esto sugiere que los grandes complejos multienzimáticos pueden ser la norma en esta vía metabólica.

Una vez formado el orotato se añade la cadena lateral de ribosa 5-fosfato, aportada una vez más por el PRPP, para dar orotidilato (Fig. 22–36).

El orotidilato se descarboxila a continuación para dar uridilato, que se fosforila a UTP. El CTP se forma a partir del UTP por acción del enzima **citidilato sintetasa,** a través de un intermediario acil fosfato (que consume un ATP). El dador de nitrógeno es normalmente la glutamina, aunque el NH_4^+ puede ser utilizado directamente por las citidilato sintetasas en muchas especies.

La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina está regulada por retroinhibición

La regulación de la velocidad de síntesis de los nucleótidos de pirimidina en las bacterias depende en gran parte de la acción del enzima aspartato transcarbamilasa (ATCasa), que cataliza la primera reacción de la secuencia, y que es inhibido por CTP, el producto final de la secuencia (Fig. 22–36). La molécula de ATCasa bacteriana consta de seis subunidades catalíticas y seis subunidades reguladoras (véase la Fig. 6–32). Las moléculas de sustrato se unen a las subunidades catalíticas, mientras que el inhibidor alostérico CTP se une a las subunidades alostéricas.

La molécula entera de ATCasa, así como sus subunidades, existe en dos conformaciones, una activa y otra inactiva. Cuando el CTP no está unido a las subunidades reguladoras la actividad enzimática es máxima. A medida que se acumula el CTP y se une a las subunidades reguladoras, éstas cambian de conformación. Este cambio se propaga a las subunidades catalíticas, que a su vez adquieren una conformación inactiva. El ATP impide los cambios inducidos por el CTP.

La **Figura 22–38** muestra los efectos de los reguladores alostéricos en la actividad de la ATCasa.

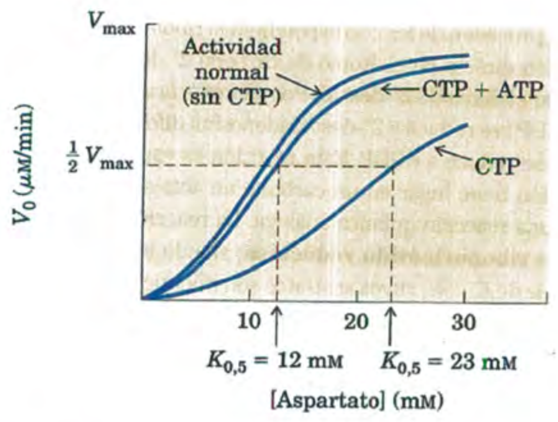


FIGURA 22–38 Regulación alostérica de la aspartato transcarbamilasa por CTP y ATP. La adición de 0,8 mM de CTP, el inhibidor alostérico de la ATCasa, aumenta la $K_{0,5}$ para el aspartato (curva inferior) y la velocidad de conversión del aspartato en *N*-carbamilaspartato. El ATP a una concentración de 0,6 mM invierte completamente este efecto (curva central).

Los nucleósidos monofosfato se convierten en nucleósidos trifosfato

Los nucleótidos que se utilizarán en las biosíntesis se convierten generalmente en nucleósidos trifosfato. Las rutas de conversión son comunes a todas las células. La fosforilación de AMP a ADP es promovida por la **adenilato quinasa,** según la reacción

$$\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2\ \text{ADP}$$

El ADP así formado se fosforila a ATP por los enzimas glucolíticos o a través de la fosforilación oxidativa.

El ATP también es responsable de la formación de otros nucleósidos difosfato gracias a la acción de una clase de enzimas denominados **nucleósido monofosfato quinasas.** Estos enzimas, que en general son específicos para una base concreta, pero no son específicos para el azúcar (ribosa o desoxirribosa), catalizan la reacción

$$\text{ATP} + \text{NMP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{NDP}$$

Los eficientes sistemas celulares de refosforilación del ADP a ATP tienden a desplazar esta reacción en la dirección de los productos.

Los nucleósidos difosfato se convierten en trifosfatos por acción de un enzima ubicuo, la **nucleósido difosfato quinasa,** que cataliza la reacción

$$\text{NTP}_\text{D} + \text{NDP}_\text{A} \rightleftharpoons \text{NDP}_\text{D} + \text{NTP}_\text{A}$$

Este enzima tiene la característica destacable de no ser específico ni para la base (purinas o pirimidinas) ni para el azúcar (ribosa o desoxirribosa). Esta falta de especificidad se manifiesta tanto para el aceptor (A) como para el dador (D) de fosfato, si bien el dador (NTP_D) es casi siempre el ATP, pues está presente en concentraciones más elevadas que los demás nucleósidos trifosfato en condiciones aeróbicas.

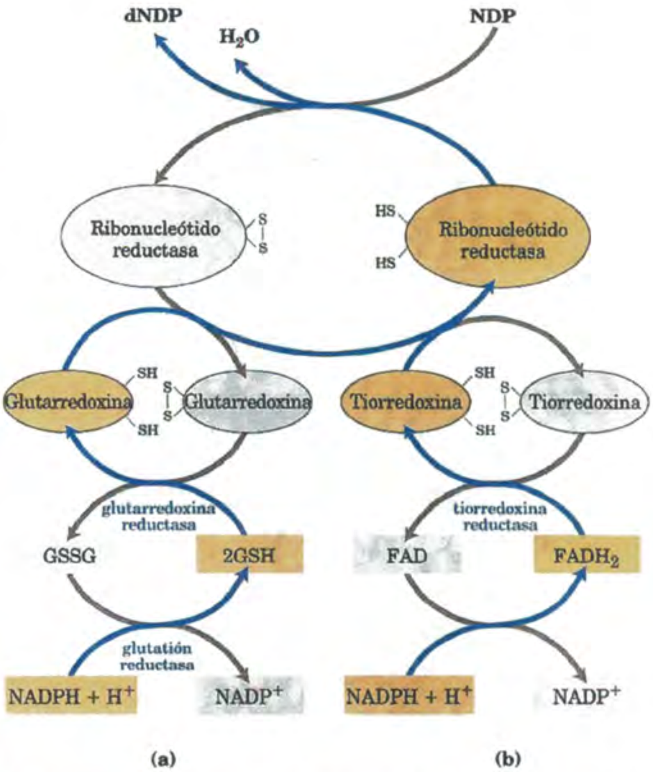


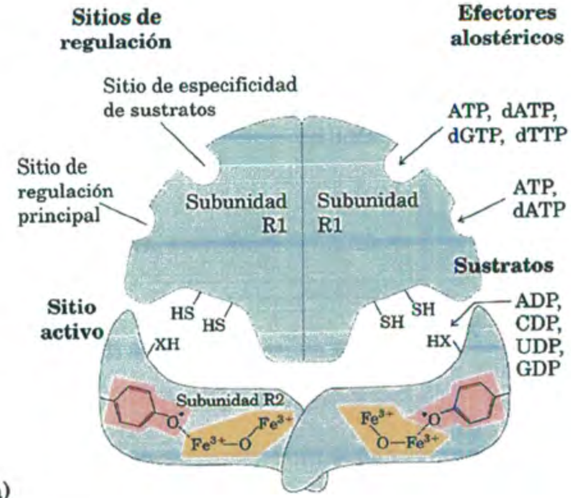
FIGURA 22–39 Reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa. Los electrones se transfieren (flechas azules) al enzima desde el NADPH a través de **(a)** la glutarredoxina o **(b)** la tiorredoxina. Los grupos sulfuro de la glutarredoxina reductasa son suministrados por dos moléculas de glutatión unido (GSH; GSSG indica glutatión oxidado). Observe que la tiorredoxina reductasa es un flavoenzima con FAD como grupo prostético.

Los ribonucleótidos son los precursores de los desoxirribonucleótidos

Los desoxirribonucleótidos, las unidades monoméricas del DNA, proceden de los correspondientes ribonucleótidos por reducción directa en el átomo de carbono 2′ de la D-ribosa para formar el derivado 2′-desoxi. Por ejemplo, la adenosina difosfato (ADP) se reduce a 2′-desoxiadenosina difosfato (dADP) y el GDP se reduce a dGDP. Esta reacción es especial, pues la reducción tiene lugar en un carbono no activado; no se conoce ninguna reacción química análoga. La reacción está catalizada por la **ribonucleótido reductasa,** siendo la mejor caracterizada la de *E. coli*, cuyos sustratos son ribonucleósidos difosfato.

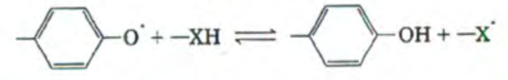
La reducción de la porción D-ribosa de un ribonucleósido difosfato a 2′-desoxi-D-ribosa precisa un par de átomos de hidrógeno que en último término proporciona el NADPH a través de una proteína transportadora de hidrógenos, la **tiorredoxina.** Esta proteína ubicua realiza funciones redox similares en la fotosíntesis (véase la Fig. 20–19) y en otros procesos. Esta proteína posee parejas de grupos —SH que transportan átomos de hidrógeno desde el NADPH hasta el ribonucleósido difosfato. La forma oxidada (disulfuro) se reduce con NADPH en una reacción catalizada por la **tiorredoxina reductasa (Fig. 22–39)**; la tiorredoxina reducida es utilizada a continuación por la ribonucleótido reductasa para reducir los nucleósidos difosfato (NDP) a desoxirribonucleósidos difosfato (dNDP). Una segunda fuente de equivalentes de reducción para la ribonucleótido reductasa es el glutatión (GSH). El glutatión actúa de reductor de una proteína estrechamente relacionada con la tiorredoxina, denominada **glutarredoxina,** la cual transfiere el poder reductor a la ribonucleótido reductasa (Fig. 22–39).

Hay que destacar que el mecanismo de reacción de la ribonucleótido reductasa es el ejemplo mejor caracterizado de la implicación de radicales libres en transformaciones bioquímicas, que antes se consideraba rara en los sistemas biológicos. El enzima presente en *E. coli* y en la mayor parte de eucariotas es un dímero compuesto por dos subunidades, R1 y R2 **(Fig. 22–40)**. La subunidad R1 contiene dos tipos de sitios reguladores, tal como se describe más adelante. Los dos sitios activos del enzima están situados en la interfase entre las subunidades R1 y R2. En cada sitio activo, R1 aporta dos grupos tiol que son necesarios para la actividad, mientras que R2 aporta un radical tirosilo estable. La subunidad R2 posee también un cofactor binuclear de hierro (Fe^{3+}) que ayuda a generar y estabilizar los radicales tirosilo (Fig. 22–40). El radical tirosilo se encuentra demasiado lejos del sitio activo para interaccionar directamente con el mismo, pero genera otro radical en el sitio activo que participa en la catálisis. Un mecanismo de reacción



(a)

(b)



(c)

FIGURA 22–40 Ribonucleótido reductasa. **(a)** Estructura en subunidades. Las funciones de los dos sitios reguladores se describen en la Fig. 22–42. Ambos sitios activos contienen dos tioles y un grupo (—XH) que puede convertirse en un radical en el sitio activo; este grupo es probablemente el —SH de la Cys^{439}, que funciona como un radical mercaptilo. **(b)** Las subunidades R2 de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* (PDB ID 1PFR). El residuo Tyr que funciona como radical tirosilo se muestra en rojo; el centro de hierro binuclear se muestra en naranja. **(c)** El radical tirosilo genera el radical del centro activo ($—X^{\cdot}$), que funciona según el mecanismo mostrado en la Figura 22–41.

probable de la ribonucleótido reductasa se muestra en la **Figura 22–41**. En *E. coli*, las probables fuentes de los equivalentes de reducción necesarios para esta reacción son la tiorredoxina y la glutarredoxina, como se ha indicado anteriormente.

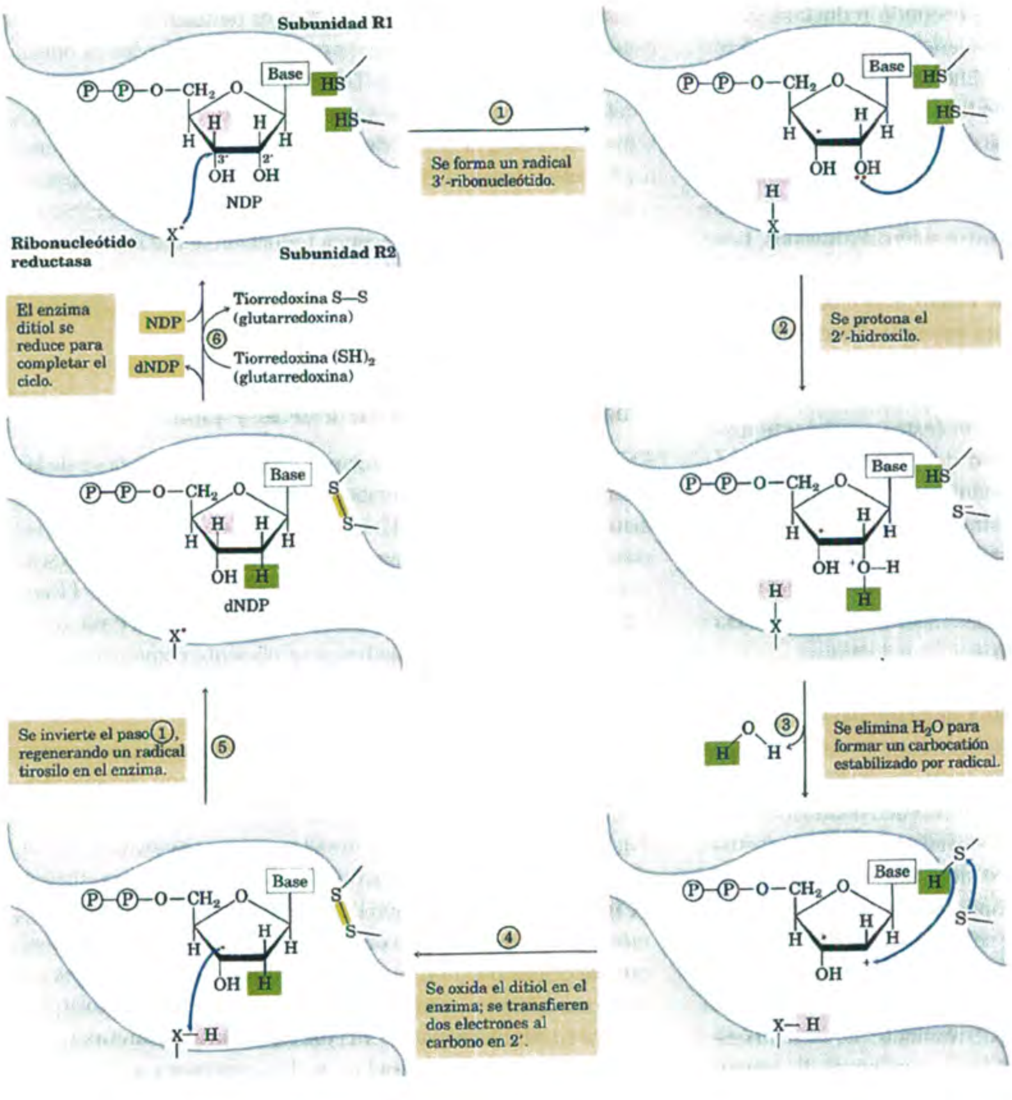


FIGURA DE MECANISMO 22–41
Mecanismo propuesto para la ribonucleótido reductasa. En el enzima de *E. coli* y de la mayoría de eucariotas, los grupos tiol activos se hallan en la subunidad R1; el radical del sitio activo ($—X^{\cdot}$) se encuentra en la subunidad R2 y es probablemente un radical mercaptilo de la Cys^{439} (véase la Fig. 22–40).

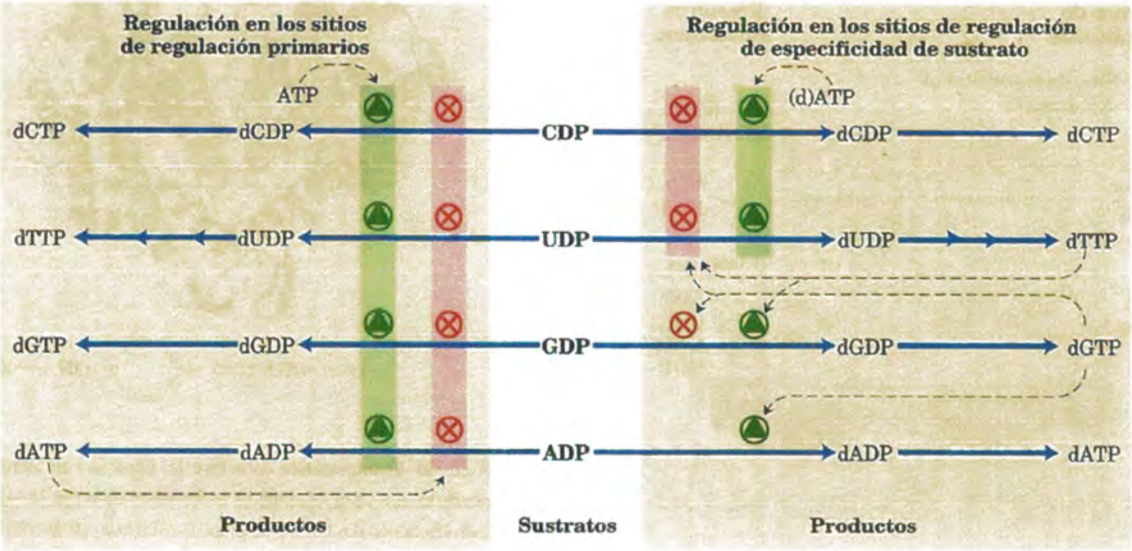


FIGURA 22–42 Regulación de la ribonucleótido reductasa por desoxinucleósidos trifosfato. La actividad global del enzima resulta afectada por la unión al sitio regulador principal (izquierda). La especificidad del enzima para el sustrato resulta afectada por la naturaleza de la molécula efectora que se une al segundo tipo de sitio regulador, el sitio de la especificidad de sustrato (derecha). El diagrama indica la inhibición o estimulación de la actividad enzimática por acción de los cuatro sustratos diferentes. La ruta de dUDP a dTTP se describe más adelante (véanse las Figs. 22–43 y 22–44).

Se conocen tres clases de ribonucleótido reductasa. Sus mecanismos (cuando son conocidos) generalmente responden al esquema de la Figura 22–41, pero difieren en la identidad del grupo que suministra el radical del sitio activo y los cofactores necesarios para generarlo. El enzima de *E. coli* (clase I) requiere oxígeno para regenerar el radical tirosilo si está apantallado, y por lo tanto sólo funciona en condiciones aeróbicas. Los enzimas de la clase II, encontrados en otros microorganismos, tienen 5′-desoxiadenosilcobalamina (véase el Recuadro 17–2) en lugar de un centro binuclear de hierro. Los enzimas de la clase III han evolucionado para funcionar en un medio anaeróbico. *E. coli* posee una ribonucleótido reductasa de la clase III diferente cuando crece en condiciones anaeróbicas; este enzima contiene un núcleo ferro-sulfurado (estructuralmente distinto del centro binuclear de hierro del enzima de clase I), requiere NADPH y *S*-adenosilmetionina para su actividad y utiliza nucleósidos trifosfato como sustratos en lugar de nucleósidos difosfato. La evolución de diferentes clases de ribonucleótido reductasas para la producción de los precursores del DNA en diferentes condiciones ambientales muestra la importancia de esta reacción en el metabolismo de los nucleótidos.

La regulación de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* no es habitual, pues no sólo su *actividad* sino también su *especificidad de sustrato* están reguladas por la unión de moléculas efectoras. Cada subunidad R1 posee dos tipos de sitio regulador (Fig. 22–40). Uno de los tipos influye en la actividad global del enzima y une ATP, que actúa como activador, o dATP, que actúa como inhibidor. El segundo tipo de sitio regulador modifica la especificidad por el sustrato en respuesta a la molécula efectora (ATP, dATP, dTTP o dGTP) que se haya unido **(Fig. 22–42)**. Cuando se une el ATP o el dATP se favorece la reducción del UDP y del CDP. Cuando se une el dTTP o el dGTP se estimula la reducción del GDP y del ADP, respectivamente. El esquema está diseñado para garantizar una reserva equilibrada de precursores para la síntesis de DNA. El ATP es también un activador genérico para la biosíntesis y para la reducción de los ribonucleótidos. La presencia de dATP en pequeñas cantidades incrementa la reducción de los nucleótidos de pirimidina. Una sobreproducción de dNTP de pirimidina se manifiesta por unos niveles elevados de dTTP, lo que provoca un cambio de especificidad que favorece la reducción de GDP. Los niveles elevados de dGTP, en cambio, favorecen la reducción del ADP, mientras que unos niveles altos de dATP inhiben el enzima. Se cree que estos efectores inducen varias conformaciones enzimáticas distintas con diferentes especificidades.

El timidilato se forma a partir de dCDP y dUMP

El DNA contiene timina en lugar de uracilo. La vía de novo de la timina sólo incluye desoxirribonucleótidos. El precursor inmediato del timidilato (dTMP) es el dUMP. En las bacterias la vía que conduce al dUMP empieza por la formación de dUTP, ya sea por desaminación del dCTP o por fosforilación del dUDP **(Fig. 22–43)**. El dUTP se convierte en dUMP por una dUTPasa. Esta última reacción debe ser lo bastante eficiente como para mantener las reservas de dUTP suficientemente bajas y evitar así la incorporación de uridilato al DNA.

La conversión del dUMP a dTMP está catalizada por la **timidilato sintasa.** Se transfiere una unidad de un carbono con el nivel de oxidación del hidroximetilo (—CH_2OH) (véase la Fig. 18–17), desde el N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato hasta el dUMP, y a continuación se reduce para dar un grupo metilo **(Fig. 22–44)**. La reducción tiene lugar a expensas de la oxidación del tetrahidrofolato a dihidrofolato, lo que es poco habitual en reacciones que utilizan el tetrahidrofolato. (Los detalles de esta reacción se muestran en la Fig. 22–50.) El dihidrofolato se reduce a tetrahidrofolato por la **dihidrofolato reductasa,** una regeneración esencial para los muchos procesos que requieren

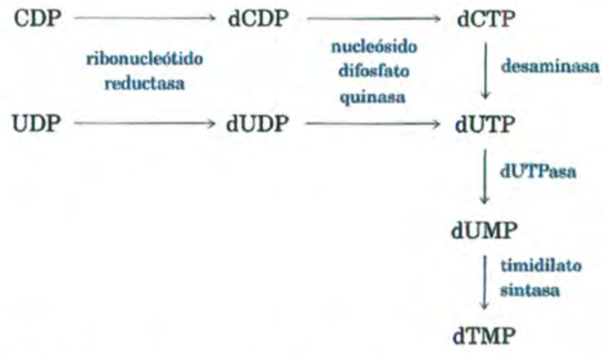


FIGURA 22–43 Biosíntesis de timidilato (dTMP). Las vías se indican empezando por la reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa. Los detalles de la reacción de la timidilato sintasa se muestran en la Fig. 22–44.

tetrahidrofolato. En las plantas y en al menos un protista, las actividades timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa se hallan en una única proteína bifuncional.

Alrededor del 10% de la población humana (y hasta el 50% en las comunidades pobres) padece deficiencia de ácido fólico. Cuando la deficiencia es grave provoca enfermedades cardíacas, cáncer y algunos tipos de disfunción cerebral. Al menos una parte de los síntomas resulta de la disminución de la síntesis de timidilato, que provoca una incorporación anormal de uracilo en el DNA. El uracilo es reconocido por los sistemas de reparación del DNA (descritos en el Capítulo 25) y es eliminado. La presencia de niveles elevados de uracilo en el DNA origina cortes en las cadenas del DNA, que pueden afectar gravemente la función y la regulación del DNA nuclear, para provocar finalmente los efectos descritos en el corazón y el cerebro, así como un aumento de la mutagénesis que favorece el cáncer. ■

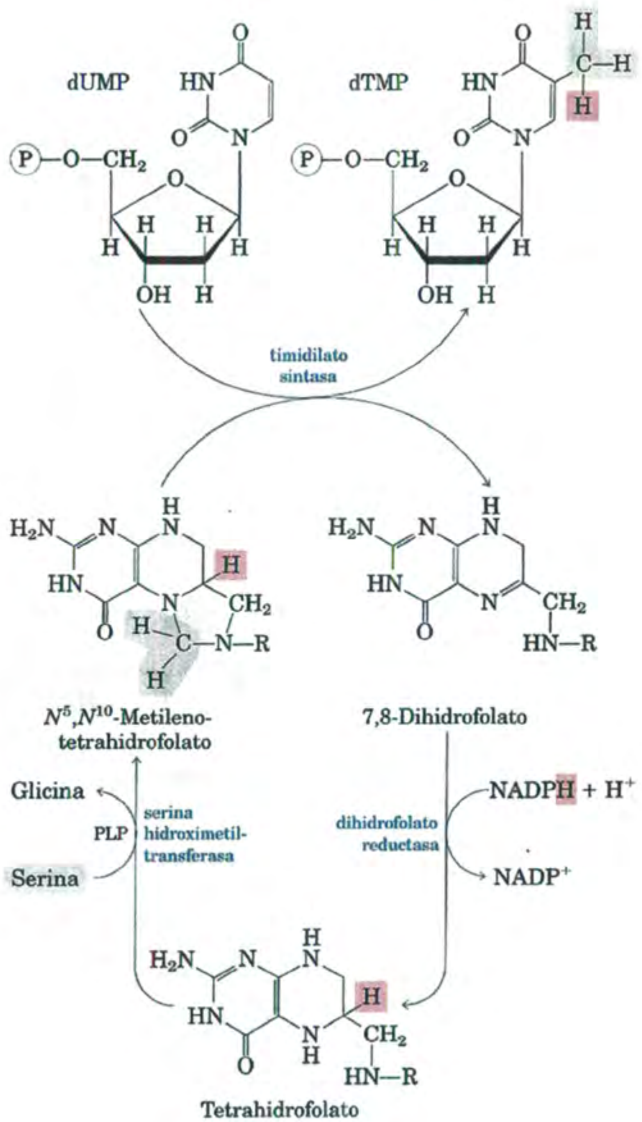


FIGURA 22–44 Conversión de dUMP en dTMP por la timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa. La serina hidroximetiltransferasa es necesaria para la regeneración de la forma N^5,N^{10}-metileno del tetrahidrofolato. En la síntesis de dTMP los tres hidrógenos del grupo metilo incorporado proceden del N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato (rosa y gris).

La degradación de las purinas y las pirimidinas produce ácido úrico y urea, respectivamente

Los nucleótidos purínicos se degradan por una vía en la que el grupo fosfato se pierde por acción de una **5′-nucleotidasa (Fig. 22–45)**. El adenilato se transforma en adenosina, que es desaminada a inosina por la **adenosina desaminasa,** y a su vez la inosina se hidroliza a hipoxantina (su base púrica) y D-ribosa. La hipoxantina se oxida sucesivamente a xantina y a ácido úrico por la **xantina oxidasa,** un flavoenzima con un átomo de molibdeno y cuatro centros ferro-sulfurados en su grupo prostético. El oxígeno molecular es el aceptor de electrones en esta compleja reacción.

El catabolismo del GMP también proporciona ácido úrico como producto final. El GMP se hidroliza primero para dar guanosina, que a continuación se descompone dando guanina libre. La hidrólisis del grupo amino de la guanina la convierte en xantina, que a su vez se transforma en ácido úrico por la xantina oxidasa (Fig. 22–45).

El ácido úrico es el producto final de excreción del catabolismo de las purinas en los primates, aves y algunos otros animales. Un ser humano adulto sano excreta ácido úrico a un ritmo de unos 0,6 g/24 h; el producto excretado procede en parte de las purinas ingeridas y en parte del recambio de nucleótidos purínicos de los ácidos nucleicos. En la mayoría de mamíferos y en muchos otros vertebrados el ácido úrico se degrada posteriormente a **alantoína** por acción de la **urato oxidasa.** En otros organismos la ruta se prolonga todavía más, como se muestra en la Figura 22–45.

Las vías para la degradación de las pirimidinas generalmente producen NH_4^+ y por tanto también estimulan la síntesis de urea. La timina, por ejemplo, se degrada a metilmalonilsemialdehído **(Fig. 22–46)**, un intermediario del catabolismo de la valina. Este compuesto se degrada posteriormente hasta

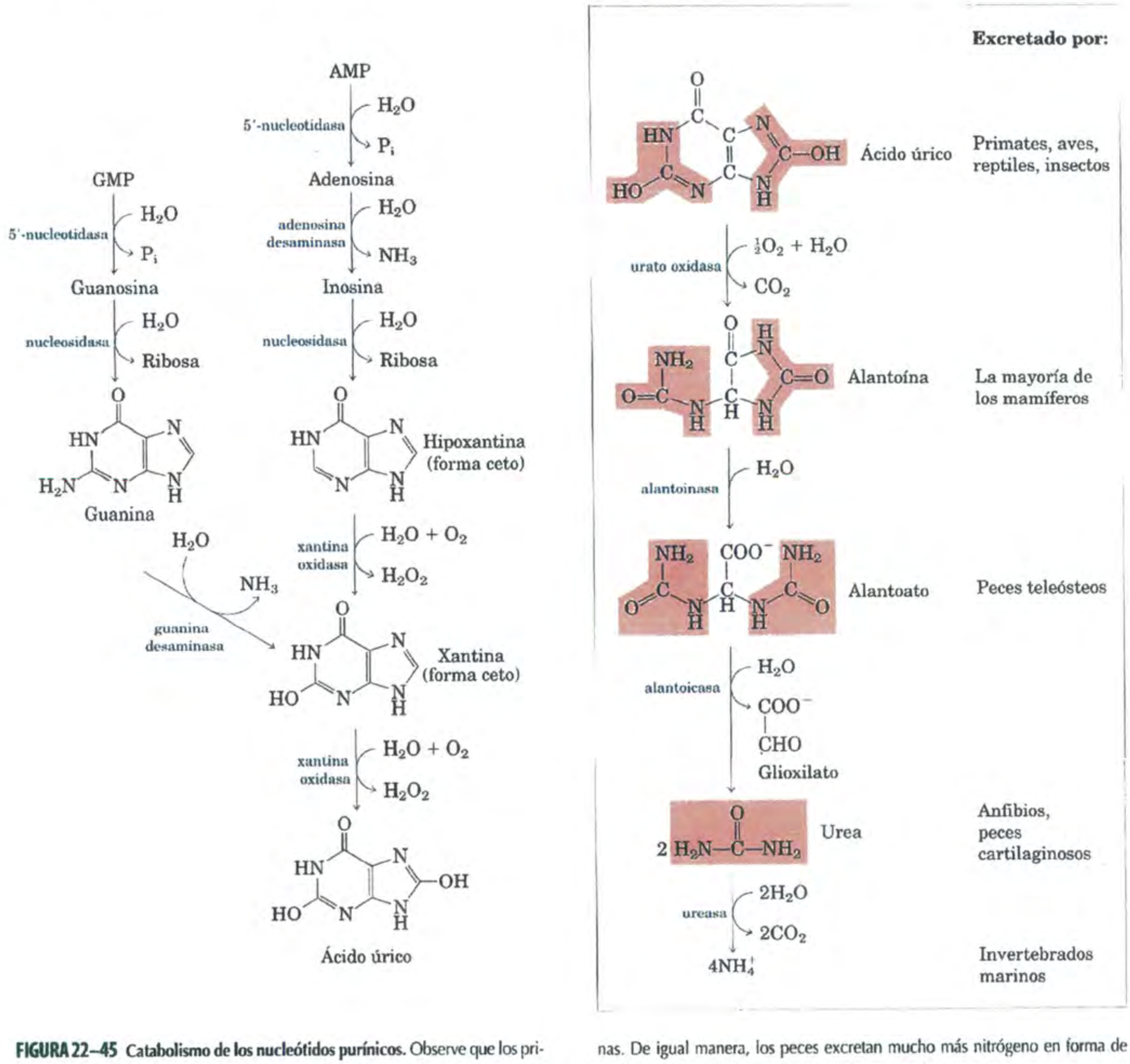


FIGURA 22–45 Catabolismo de los nucleótidos purínicos. Observe que los primates excretan mucho más nitrógeno como urea, a través del ciclo de la urea (Capítulo 18), que como ácido úrico procedente de la degradación de las purinas. De igual manera, los peces excretan mucho más nitrógeno en forma de NH_4^+ que de urea, producida por la vía que aquí se muestra.

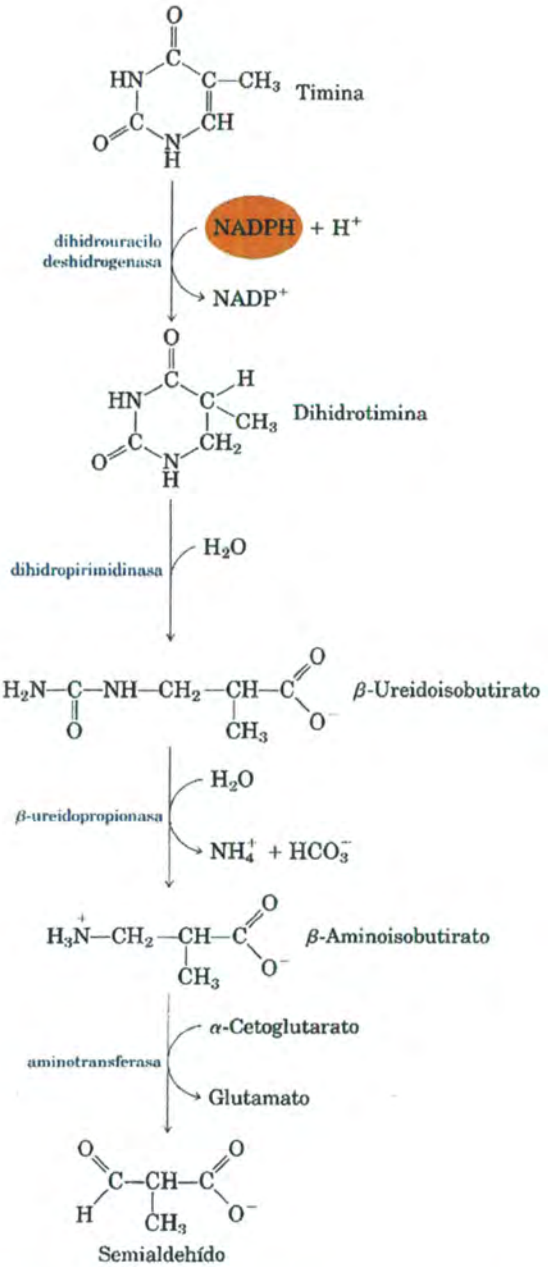


FIGURA 22–46 Catabolismo de una pirimidina. Se muestra la vía de degradación de la timina. El metilmalonilsemialdehído continúa degradándose hasta succinil-CoA.

succinil-CoA a través de propionil-CoA y metilmalonil-CoA (véase la Fig. 18–27).

Se han descrito anomalías genéticas en el metabolismo humano de las purinas, algunas con graves consecuencias. Por ejemplo, la **deficiencia de adenosina desaminasa (ADA)** provoca una inmunodeficiencia grave, en la que los linfocitos T y los linfocitos B no se desarrollan correctamente. La falta de ADA conduce a un aumento de unas 100 veces en la concentración de dATP, un potente inhibidor de la ribonucleótido reductasa (Fig. 22–42). Niveles elevados de dATP provocan un déficit general de los otros dNTP en los linfocitos T. Las bases de la toxicidad en los linfocitos B son menos claras. Los individuos con deficiencia de ADA carecen de un sistema inmunitario eficaz y no pueden sobrevivir a menos que se les mantenga aislados en un ambiente, o "burbuja", estéril. La deficiencia de ADA fue uno de los primeros objetivos de los ensayos de terapia génica en humanos (véase el Recuadro 9–2). ■

Las bases púricas y pirimidínicas se reciclan a través de vías de recuperación

En la degradación metabólica celular de los nucleótidos se forman constantemente bases púricas y pirimidínicas libres. Las purinas libres se recuperan en gran parte y vuelven a ser utilizadas para sintetizar nucleótidos, en una ruta mucho más sencilla que la síntesis de novo de los nucleótidos de purina descrita anteriormente. Una de las rutas primarias de recuperación consiste en una única reacción catalizada por la **adenosina fosforribosiltransferasa,** en la que la adenina libre reacciona con el PRPP para dar el correspondiente nucleótido de adenina:

$$\text{Adenina} + \text{PRPP} \longrightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$$

La guanina y la hipoxantina libres (el producto de la desaminación de la adenina; Fig. 22–45) se recuperan de la misma forma por la **hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa.** En los microorganismos, y posiblemente en mamíferos, existe una ruta parecida para la recuperación de las bases pirimidínicas.

Una carencia genética de actividad hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa se ha descrito tan sólo en niños varones y se manifiesta con una serie de síntomas peculiares que se conocen como **síndrome de Lesch-Nyhan.** Los niños afectados por esta enfermedad genética, que empieza a manifestarse alrededor de los dos años de edad, padecen retraso mental y mala coordinación. Son, además, tremendamente hostiles y muestran tendencias compulsivas autodestructivas: se automutilan mordiéndose los labios y los dedos de manos y pies.

Los efectos del síndrome de Lesch-Nyhan son ilustrativos de la importancia de las rutas de recuperación. La hipoxantina y la guanina se forman continuamente como productos de degradación de los ácidos nucleicos. En ausencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa aumentan los niveles de PRPP, lo que conduce a un incremento de la síntesis de novo de purinas, que a su vez repercute en niveles elevados de ácido úrico y a lesiones tisulares parecidas a las que tienen lugar en la gota (véase más adelante). El cerebro depende especialmente de las rutas de recuperación, hecho que puede estar relacionado con los trastornos en el sistema nervioso central que se manifiestan en los niños con síndrome de Lesch-Nyhan. Este síndrome fue otro de los objetivos de las primeras pruebas de terapia génica (véase el Recuadro 9–2). ■

El exceso de ácido úrico provoca la gota

La gota, erróneamente relacionada durante mucho tiempo con la "buena vida", es una enfermedad de las articulaciones debida a una concentración elevada de ácido úrico en la sangre y en los tejidos. Las articulaciones se inflaman, producen dolor y desarrollan artritis a causa de una deposición anormal de cristales de urato sódico. Los riñones también resultan afectados, porque el exceso de ácido úrico se deposita en los túbulos renales. La gota afecta principalmente a los individuos de sexo masculino. Su causa exacta es desconocida, pero a menudo implica una subexcreción de urato. En algunos casos podría existir una deficiencia genética de algún enzima del metabolismo de las purinas.

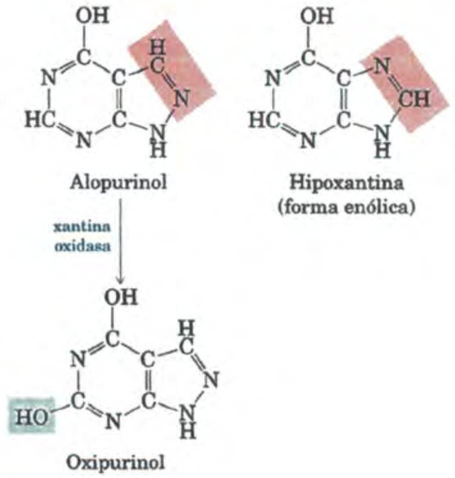


FIGURA 22–47 El alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa. La hipoxantina es el sustrato normal de la xantina oxidasa. Sólo una pequeña modificación en la estructura del sustrato hipoxantina (sombreada en rosa) produce el inhibidor enzimático alopurinol que tiene efectos terapéuticos. En el sitio activo el alopurinol se convierte en oxipurinol, un potente inhibidor competitivo que permanece unido fuertemente a la forma reducida del enzima.

La gota se trata eficazmente mediante una combinación de terapia nutricional y farmacológica. Deben suprimirse de la dieta los alimentos especialmente ricos en nucleótidos y ácidos nucleicos, tales como el hígado o los productos glandulares. Se consigue una mejoría importante de los síntomas con el fármaco **alopurinol (Fig. 22–47)**, un inhibidor de la xantina oxidasa, el enzima que cataliza la transformación de las purinas en ácido úrico. El alopurinol es un sustrato de la xantina oxidasa, que convierte el alopurinol en oxipurinol (aloxantina). El oxipurinol inactiva la forma reducida del enzima al permanecer fuertemente unido al sitio activo. Cuando la xantina oxidasa está inhibida, los productos de excreción del metabolismo de las purinas son la xantina y la hipoxantina, que son más hidrosolubles que el ácido úrico y tienen menor probabilidad de formar depósitos cristalinos. El alopurinol fue desarrollado por Gertrude Elion y George Hitchings, quienes también desarrollaron el aciclovir, utilizado para el tratamiento del herpes, y otros análogos de purinas utilizados en la quimioterapia contra el cáncer. ■

Gertrude Elion (1918–1999) y
George Hitchings (1905–1998)

Muchos agentes quimioterapéuticos actúan sobre enzimas de las rutas de biosíntesis de nucleótidos

El crecimiento de las células cancerosas no está controlado de la misma manera que el crecimiento celular en la mayoría de tejidos normales. Las células cancerosas tienen mayores requerimientos de nucleótidos como precursores de la síntesis de DNA y RNA y en consecuencia suelen ser más sensibles que las células normales a inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos. Toda una serie, que va en aumento, de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer y otras enfermedades actúan por inhibición de uno o más enzimas de estas vías. Examinaremos algunos ejemplos bien estudiados de terapias eficaces contra el cáncer, que ayudan a comprender cómo funcionan estos enzimas.

La primera serie de agentes consiste en compuestos que inhiben las glutamina amidotransferasas. Recuerde que la glutamina es un dador de nitrógeno en al menos seis reacciones distintas en la biosíntesis de nucleótidos. Los sitios de unión de la glutamina y los mecanismos mediante los que se extrae el NH_4^+ son bastante parecidos en muchos de estos enzimas. La mayoría son fuertemente inhibidos por análogos de la glutamina tales como la **azaserina** y la **acivicina (Fig. 22–48)**. La azaserina, caracterizada por John Buchanan en la década de 1950, fue uno de los primeros ejemplos de un inactivador que actuaba a través de un mecanismo enzimático (inhibidor suicida; p. 204 y Recuadro 22–3). La acivicina promete ser un buen agente quimioterapéutico anticancerígeno.

Otras dianas útiles para agentes farmacológicos son los enzimas timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa. Ambos proporcionan la única vía celular para la síntesis de timina **(Fig. 22–49)**. Un inhibidor que actúa sobre la timidilato sintasa, el **fluorouracilo,** es un importante agente quimioterapéutico. El fluorouracilo no es en sí mismo el inhibidor enzimático. En la célula, las vías de recuperación lo convierten en el desoxinucleósido monofosfato, FdUMP, que se une al enzima y lo inactiva. La inhibición por FdUMP **(Fig. 22–50)** es un ejemplo clásico de inactivación basada en un mecanismo enzimático. Otro agente quimioterapéutico importante, el **metotrexato,** es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa. Este análogo del folato actúa como inhibidor competitivo; el metotrexato se une al enzima con una afinidad unas 100 veces mayor que el dihidrofolato. La **aminopterina** es un compuesto relacionado que actúa de forma similar.

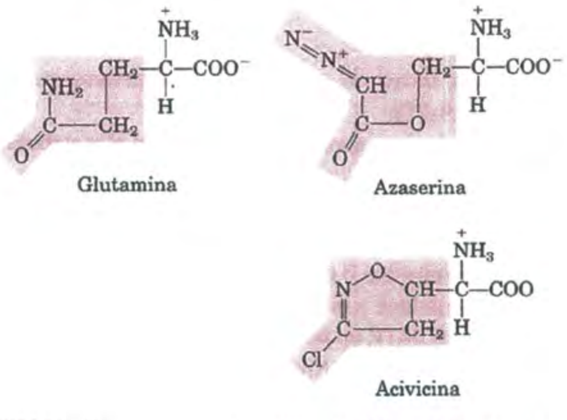


FIGURA 22–48 La azaserina y la acivicina, inhibidores de las glutamina amidotransferasas. Estos análogos de la glutamina interfieren en toda una serie de rutas biosintéticas de aminoácidos y nucleótidos.

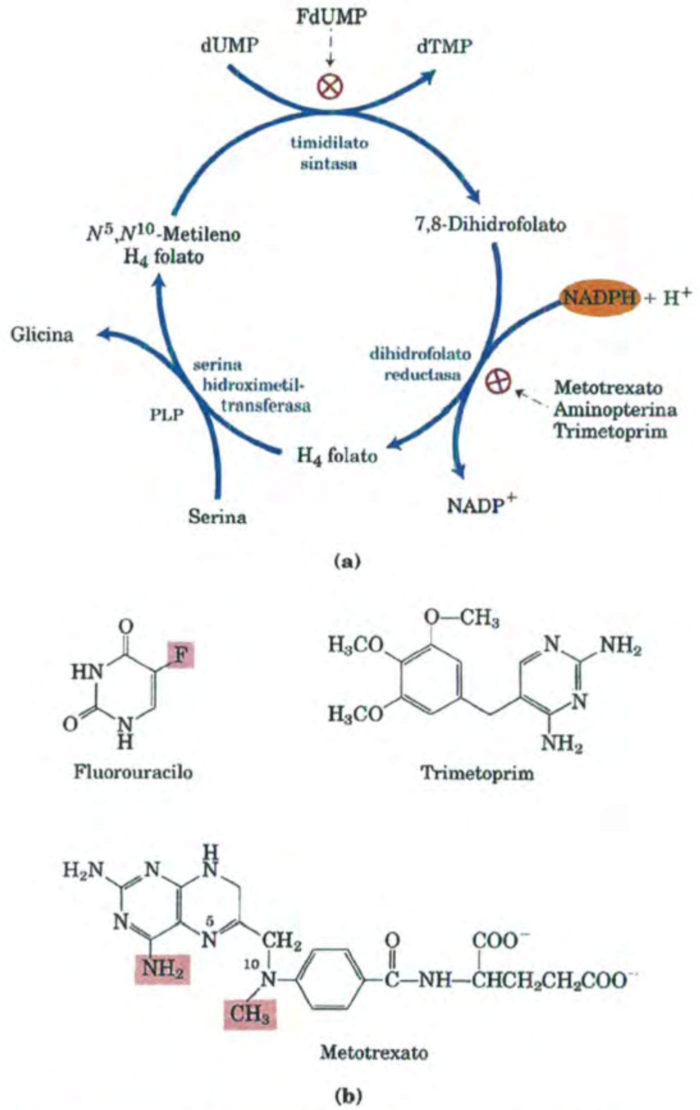


FIGURA 22–49 Síntesis del timidilato y metabolismo del folato como objetivos quimioterapéuticos. **(a)** Durante la síntesis del timidilato, el N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato se convierte en 7,8-dihidrofolato; el N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato se regenera en dos pasos (véase la Fig. 22–44). Este ciclo es una de las principales dianas de varios agentes quimioterapéuticos. **(b)** Los compuestos fluorouracilo y metotrexato son importantes agentes en quimioterapia. En las células el fluorouracilo se convierte en FdUMP, que inhibe la timidilato sintasa. El metotrexato es un análogo estructural del tetrahidrofolato, que inhibe la dihidrofolato reductasa; los grupos amino y metilo sombreados sustituyen respectivamente a un oxígeno carbonílico y a un protón en el folato (véase la Fig. 22–44). Otro análogo importante del folato, la aminopterina, es idéntica al metotrexato, exceptuando que carece del grupo metilo sombreado. El trimetoprim, un inhibidor de alta afinidad de la dihidrofolato reductasa bacteriana, se desarrolló como antibiótico.

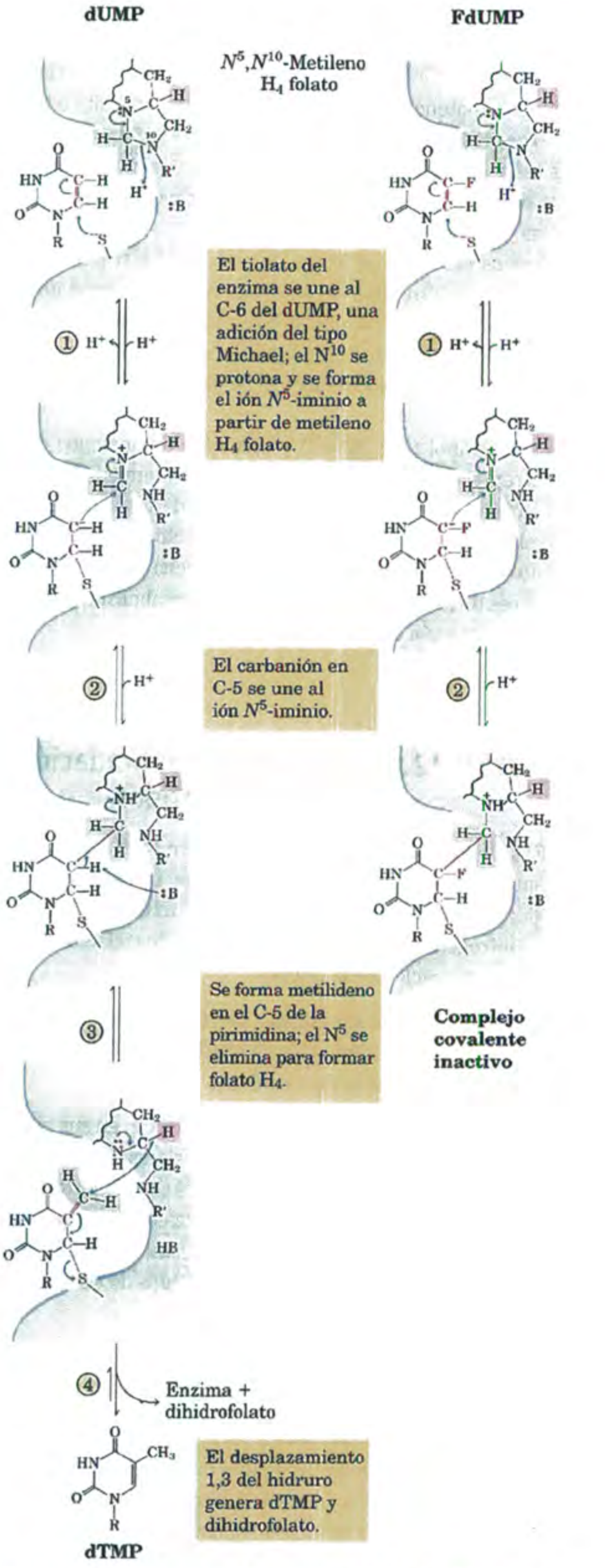


FIGURA DE MECANISMO 22–50 Conversión del dUMP en dTMP y su inhibición por FdUMP. En el lado izquierdo se representa el mecanismo de reacción normal de la timidilato sintasa. El grupo sulfhidrilo nucleofílico aportado por el enzima en el paso ① y los átomos del anillo de dUMP que participan en la reacción se muestran en rojo; **:**B indica una cadena lateral de un aminoácido que actúa como base para capturar un protón después del paso ③. Los hidrógenos procedentes del grupo metileno del N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato están sombreados en gris. El desplazamiento 1,3 de un hidruro (paso ③), desplaza un ión hidruro (sombreado en rosa) desde el C-6 del folato H_4 hasta el grupo metilo de la timidina, provocando la oxidación del tetrahidrofolato a dihidrofolato. Este desplazamiento de un hidruro no se produce cuando el sustrato es el análogo FdUMP (derecha). Los pasos ① y ② de la reacción proceden normalmente, pero se forma un complejo estable con el FdUMP, unido covalentemente al enzima y al tetrahidrofolato, que inactiva el enzima. **Mecanismo de la timidilato sintasa**

El potencial terapéutico de los inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos no se limita al tratamiento del cáncer. Todas las células de crecimiento rápido (incluidas bacterias y protistas) son objetivos potenciales. El **trimetoprim,** un antibiótico desarrollado por Hitchings y Elion, se une a la dihidrofolato reductasa bacteriana unas 100.000 veces más fuertemente que al enzima de mamíferos. Se utiliza para tratar ciertas infecciones urinarias y del oído medio.

Algunos protistas parásitos, tales como los tripanosomas que causan la enfermedad del sueño en África (tripanosomiasis africana), carecen de rutas para la biosíntesis de novo de nucleótidos y resultan muy sensibles a agentes que interfieran con sus rutas de captación de nucleótidos del entorno utilizando vías de recuperación.

El alopurinol (Fig. 22–47) y una serie de análogos de las purinas representan una esperanza para el tratamiento de la tripanosomiasis africana y de otras enfermedades relacionadas. Véase el Recuadro 22–3 para una aproximación distinta del tratamiento de la tripanosomiasis africana, hecha posible gracias a los avances de los conocimientos sobre el metabolismo y los mecanismos de acción de los enzimas. ■

RESUMEN 22.4 Biosíntesis y degradación de los nucleótidos

- El sistema anular purínico se construye paso a paso empezando con la 5-fosforribosilamina. Los aminoácidos glutamina, glicina y aspartato aportan todos los átomos de nitrógeno de las purinas. Dos pasos de ciclación forman el núcleo de la purina.
- Las pirimidinas se sintetizan a partir de carbamil fosfato y aspartato. A continuación se añade ribosa 5-fosfato para dar nucleótidos de pirimidina.
- Los nucleósidos monofosfato se convierten en sus correspondientes trifosfatos mediante reacciones de fosforilación enzimáticas. Los ribonucleótidos se convierten en desoxirribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa, un enzima con características mecanísticas y reguladoras hasta ahora no descritas. Los nucleótidos de timina proceden del dCMP y dUMP.
- El ácido úrico y la urea son los productos finales de la degradación de purinas y pirimidinas.
- Las purinas libres se pueden recuperar y volver a integrar en nucleótidos. Defectos genéticos en ciertos enzimas de recuperación son la causa de enfermedades graves tales como el síndrome de Lesch-Nyhan y la deficiencia de ADA.
- La acumulación de cristales de ácido úrico en las articulaciones, debida probablemente a otro defecto genético, da lugar a la gota.
- Los enzimas de las rutas biosintéticas de nucleótidos son la diana de toda una serie de agentes quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

ciclo del nitrógeno 852
fijación del nitrógeno 852
anamox 852
simbiontes 852
complejo de la nitrogenasa 854
leghemoglobina 856
glutamina sintetasa 857
glutamato sintasa 857
glutamina amidotransferasas 859
5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) 861
triptófano sintasa 868
porfirina 873
porfiria 873
bilirrubina 875
fosfocreatina 876
creatina 876
glutatión (GSH) 876
auxina 878
dopamina 878
noradrenalina 878
adrenalina 878
γ-aminobutirato (GABA) 878
serotonina 878
histamina 878
cimetidina 879
espermina 879
espermidina 879
ornitina descarboxilasa 879
ruta de novo 882
ruta de recuperación 882
inosinato (IMP) 883
carbamil fosfato sintetasa II 886
aspartato transcarbamilasa 887
nucleósido monofosfato quinasa 888
nucleósido difosfato quinasa 888
ribonucleótido reductasa 888
tiorredoxina 888
timidilato sintasa 890
dihidrofolato reductasa 890
deficiencia de adenosina desaminasa (ADA) 893
síndrome de Lesch-Nyhan 893
alopurinol 894
azaserina 894
acivicina 894
fluorouracilo 894
metotrexato 894
aminopterina 894

Bibliografía

Fijación del nitrógeno

Arp, D.J. & Stein, L.Y. (2003) Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38,** 491–495.

Burris, R.H. (1995) Breaking the N–N bond. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46,** 1–19.

Fuerst, J.A. (2005) Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **59,** 299–328.

Igarishi, R.Y. & Seefeldt, L.C. (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38,** 351–384.

Patriarca, E.J., Tate, R., & Iaccarino, M. (2002) Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66,** 203–222.

Una buena visión global de la asimilación del nitrógeno en sistemas bacterianos y su regulación.

Prell, J. & Poole, P. (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* **14,** 161–168.

Una buena síntesis de las intrincadas relaciones simbióticas entre *Rhizobium* y sus huéspedes.

Sinha, S.C. & Smith, J.L. (2001) The PRT protein family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11,** 733–739.

Descripción de una familia de proteínas que incluye muchas amidotransferasas, con canales para el movimiento del NH_3 de un sitio activo a otro.

Biosíntesis de aminoácidos

Frey, P.A. & Hegeman, A.D. (2007) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.

Revisión actualizada de mecanismos de reacción, entre los que se incluyen el metabolismo monocarbonado y los enzimas dependientes de piridoxal fosfato.

Neidhardt, F.C. (ed.). (1996) Escherichia coli *and* Salmonella: *Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn, ASM Press, Washington, DC.

El Volumen 1 de este conjunto de dos volúmenes tiene 13 capítulos dedicados a descripciones detalladas de la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos en bacterias. La versión presente en la web, www.ecosal.org, se pone al día de forma regular. Una fuente valiosa.

Pan P., Woehl, E., & Dunn, M.F. (1997) Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 22–27.

Richards, N.G.J. & Kilberg, M.S. (2006) Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 629–654.

Compuestos derivados de aminoácidos

Ajioka R.S., Phillips, J.D., & Kushner, J.P. (2006) Biosynthesis of heme in mammals *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1763**, 723–736.

Bredt, D.S. & Snyder, S.H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 175–195.

Meister, A. & Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711–760.

Morse, D. & Choi, A.M.K. (2002) Heme oxygenase-1—the "emerging molecule" has arrived. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **27**, 8–16.

Rondon, M.R., Trzebiatowski, J.R., & Escalante-Semerena, J.C. (1997) Biochemistry and molecular genetics of cobalamin biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **56**, 347–384.

Stadtman, T.C. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 83–100.

Biosíntesis de nucleótidos

Carreras, C.W. & Santi, D.V. (1995) The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 721–762.

Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**, 13,963–13,966.

Kappock, T.J., Ealick, S.E., & Stubbe, J. (2000) Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 567–572.

Kornberg, A. & Baker, T.A. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Este texto incluye un buen resumen de la biosíntesis de nucleótidos.

Licht, S., Gerfen, G.J., & Stubbe, J. (1996) Thiyl radicals in ribonucleotide reductases. *Science* **271**, 477–481.

Nordlund, P. & Reichard, P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 681–706.

Schachman, H.K. (2000) Still looking for the ivory tower. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 1–29.

Una descripción de la investigación sobre la aspartato transcarbamilasa acompañada de anécdotas sobre ciencia y política.

Stubbe, J. & Riggs-Gelasco, P. (1998) Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 438–443.

Enfermedades genéticas

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Valle, D., Sly, W.S., Childs, B., Kinzler, L.W., & Vogelstein, B. (eds). (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, McGraw-Hill Professional, New York.

Este conjunto de cuatro volúmenes contiene buenos capítulos sobre las alteraciones del metabolismo de los aminoácidos, las porfirinas y el grupo hemo. Véanse también los capítulos sobre los errores innatos del metabolismo de las purinas y las pirimidinas.

Problemas

1. Consumo de ATP por los nódulos de las raíces de plantas leguminosas Las bacterias que residen en los nódulos de las raíces de la planta del guisante consumen más del 20% del ATP que produce la planta. Sugiera alguna razón para que estas bacterias consuman tanto ATP.

2. Glutamato deshidrogenasa y síntesis proteica La bactería *Methylophilus methylotrophus* puede sintetizar proteína a partir de metanol y amoníaco. La introducción mediante técnicas de DNA recombinante del gen de la glutamato deshidrogenasa de *E. coli* en *M. methylotrophus* mejora el rendimiento de proteína. ¿Por qué esta manipulación genética mejora el rendimiento de proteína?

3. Mecanismos de reacción con participación del PLP El piridoxal fosfato puede catalizar transformaciones a uno o dos carbonos del carbono α de un aminoácido. El enzima treonina sintasa (véase la Fig. 22–15) cataliza la conversión dependiente de PLP de la fosfohomoserina en treonina. Sugiera un mecanismo para esta reacción.

4. Transformación de aspartato en asparagina Hay dos rutas para transformar el aspartato en asparagina a expensas de ATP. Muchas bacterias tienen una asparagina sintetasa que usa el ión amonio como fuente de nitrógeno. Los mamíferos tienen una asparagina sintetasa que usa glutamina como fuente de nitrógeno. Dado que esta última requiere un ATP extra (para la síntesis de glutamina), ¿por qué los mamíferos usan esta ruta?

5. Ecuación de la síntesis de aspartato a partir de glucosa Escriba la ecuación neta para la síntesis de aspartato (un aminoácido no esencial) a partir de glucosa, dióxido de carbono y amoníaco.

6. Inhibidores de la asparagina sintetasa en la terapia de la leucemia La asparagina sintetasa de mamíferos es una amidotransferasa dependiente de glutamina. Los esfuerzos para identificar un inhibidor efectivo de la asparagina sintetasa humana para usarlo en quimioterapia para pacientes que padecen leucemia no se han centrado en el dominio amino terminal con actividad glutaminasa, sino en el carboxi terminal con actividad sintetasa. Explique por qué el dominio de la glutaminasa no es un objetivo prometedor en la búsqueda de un fármaco eficaz.

7. Deficiencia de fenilalanina hidroxilasa y dieta La tirosina es normalmente un aminoácido no esencial, pero las personas con una deficiencia genética de fenilalanina hidroxilasa precisan tirosina en la dieta para un crecimiento normal. Explíquelo.

8. Cofactores para las reacciones de transferencia de un carbono La mayor parte de las transferencias de un carbono están facilitadas por uno de estos tres cofactores: biotina, tetrahidrofolato o *S*-adenosilmetionina (Capítulo 18). La *S*-adenosilmetionina se utiliza generalmente como dador de grupos metilo; el potencial de transferencia de grupos metilo del N^5-metiltetrahidrofolato resulta insuficiente para la mayoría de reacciones biosintéticas. Sin embargo, un ejemplo de la utilización de N^5-metiltetrahidrofolato en la transferencia de grupos meti-

lo es la formación de metionina por la reacción de la metionina sintasa (paso ⑨ de la Fig. 22–15); la metionina es el precursor inmediato de la *S*-adenosilmetionina (véase la Fig. 18–18). Explique por qué el grupo metilo de la *S*-adenosilmetionina puede proceder del N^5-metiltetrahidrofolato, a pesar de que el potencial de transferencia del grupo metilo en el N^5-metiltetrahidrofolato es unas 10^3 veces menor que en la *S*-adenosilmetionina.

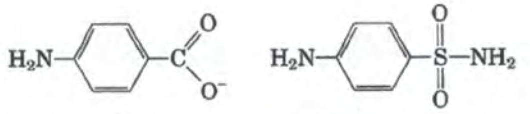
9. Regulación concertada en la biosíntesis de aminoácidos La glutamina sintetasa de *E. coli* es modulada independientemente por varios productos del metabolismo de la glutamina (véase la Fig. 22–6). En esta inhibición concertada, la magnitud de la inhibición enzimática es mayor que la suma de las inhibiciones causadas por cada producto. ¿Cuál sería la ventaja de la inhibición concertada para *E. coli* creciendo en un medio rico en histidina?

10. Relación entre deficiencia de ácido fólico y anemia La deficiencia de ácido fólico, considerada la deficiencia vitamínica más común, es causa de un tipo de anemia en la que disminuye la síntesis de hemoglobina y los eritrocitos no maduran adecuadamente. ¿Cuál es la relación metabólica entre la síntesis de hemoglobina y la deficiencia de ácido fólico?

11. Biosíntesis de nucleótidos en bacterias auxotróficas para aminoácidos Las células de *E. coli* normales pueden sintetizar los 20 aminoácidos estándar, pero algunos mutantes, llamados auxótrofos para los aminoácidos, son incapaces de sintetizar un aminoácido específico y necesitan que éste sea añadido al medio de cultivo para un crecimiento óptimo. Además de su papel en la síntesis de proteínas, algunos aminoácidos también son precursores de otros productos celulares nitrogenados. Considere los tres auxótrofos para aminoácidos incapaces de sintetizar glicina, glutamina y aspartato, respectivamente. Para cada mutante, ¿qué productos nitrogenados, además de las proteínas, no podrían ser sintetizados por la célula?

12. Inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos Sugiera posibles mecanismos para la inhibición de (a) la alanina racemasa por la L-fluoroalanina y (b) la glutamina amidotransferasa por la azaserina.

13. Modo de acción de las sulfamidas Algunas bacterias necesitan la presencia de *p*-aminobenzoato en el medio de cultivo para su crecimiento normal. El crecimiento de estas bacterias se inhibe de forma importante al añadir sulfanilamida, una de las primeras sulfamidas. Además, en presencia de este medicamento, se acumula en el medio de cultivo el compuesto 5′-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR; véase la Fig. 22–33). Estos efectos se invierten al añadir al medio un exceso de *p*-aminobenzoato.



p-Aminobenzoato Sulfanilamida

(a) ¿Cuál es el papel del *p*-aminobenzoato en estas bacterias? (Pista: véase la Fig. 18–16.)

(b) ¿Por qué se acumula AICAR en presencia de sulfanilamida?

(c) ¿Por qué la inhibición y la acumulación pueden invertirse al añadir un exceso de *p*-aminobenzoato?

14. Ruta del carbono en la biosíntesis de pirimidinas Pronostique la localización del ^{14}C en el orotato aislado de células que hayan crecido en presencia de una pequeña cantidad de succinato marcado uniformemente con ^{14}C. Dé una explicación de su respuesta.

15. Los nucleótidos son fuentes pobres en energía En condiciones de ayuno, los organismos pueden usar proteínas y aminoácidos como fuentes de energía. La desaminación de los aminácidos produce esqueletos carbonados que pueden entrar en la ruta glucolítica y en ciclo del ácido cítrico para producir energía en forma de ATP. Por su parte, los nucleótidos no se degradan de forma similar para su uso como combustibles. ¿Qué observaciones sobre la fisiología celular apoyan esta afirmación? ¿Qué aspecto de la estructura de los nucleótidos les hace una fuente relativamente pobre en energía?

16. Tratamiento de la gota El alopurinol (véase la Fig. 22–47), un inhibidor de la xantina oxidasa, se utiliza para tratar la gota crónica. Explique las bases bioquímicas de este tratamiento. Los pacientes tratados con alopurinol a veces pueden desarrollar cálculos de xantina en el riñón, aunque la incidencia de la lesión renal es muy inferior que en la gota sin tratar. Explique esta observación teniendo en cuenta las siguientes solubilidades en la orina: ácido úrico, 0,15 g/L; xantina, 0,05 g/L e hipoxantina, 1,4 g/L.

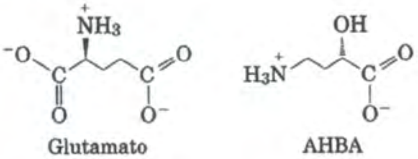
17. Inhibición de la síntesis de nucleótidos por la azaserina El compuesto diazo *O*-(2-diazoacetil)-L-serina, también conocido como azaserina (véase la Fig. 22–48), es un potente inhibidor de las glutamina amidotransferasas. Si las células en crecimiento se tratan con azaserina, ¿qué intermediarios de la biosíntesis de nucleótidos se acumularán? Explíquelo.

Problema de análisis de datos

18. Utilización de las modernas técnicas moleculares para establecer la ruta biosintética de un nuevo aminoácido La mayoría de las rutas biosintéticas descritas en este capítulo fueron establecidas antes del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y la genómica; por tanto, las técnicas fueron muy diferentes de las que hoy se utilizarían. Desarrollaremos un ejemplo de la aplicación de las modernas técnicas moleculares a la investigación de la ruta de síntesis de un nuevo aminoácido, (2*S*)-4-amino-2-hidroxibutirato (AHBA). Las técnicas que aquí se mencionan se describen en diversos lugares del libro; este problema pretende mostrar cómo éstas pueden combinarse en función de un objetivo.

El AHBA es un γ-aminoácido que forma parte de algunos antibióticos aminoglucósidos, entre ellos la butirosina. Los antibióticos modificados por adición de un residuo de AHBA son a menudo más resistentes frente a la inactivación por los enzimas bacterianos de resistencia a antibióticos. Por ello, saber cómo se sintetiza y se incorpora el AHBA a los antibióticos puede ser útil en el diseño de fármacos.

En un artículo publicado en 2005, Li y colaboradores describen cómo determinaron la ruta de biosíntesis del AHBA a partir de glutamato.



Glutamato AHBA

(a) Describa brevemente las transformaciones químicas necesarias para convertir el glutamato en AHBA. De momento, no se preocupe del *orden* de las reacciones.

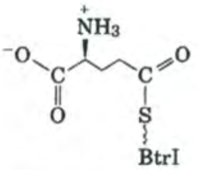
Li y colaboradores empezaron por clonar el agrupamiento de genes responsables de la síntesis de la butirosina de *Baci-*

llus circulans, que sintetiza grandes cantidades de butirosina. Identificaron cinco genes esenciales para la ruta: *btrI*, *btrJ*, *btrK*, *btrO* y *btrV*. Clonaron estos genes en plásmidos de *E. coli* que permiten la sobreexpresión de los genes y producen proteínas con "etiquetas de histidina" (véase la p. 314) en el extremo amino terminal para facilitar su purificación.

La secuencia de aminoácidos predicha para la proteína BtrI mostraba una gran homología de secuencia con las proteínas transportadoras de acilos (véase la Fig. 21–5). Mediante espectrometría de masas (véase el Recuadro 3–2), Li y colaboradores encontraron que la masa molecular de la proteína BtrI purificada era 11.812 (incluyendo la etiqueta de His). Después de incubar con coenzima A y un enzima capaz de unir CoA a otras proteínas transportadoras de acilo, la mayoría de especies moleculares poseían una M_r de 12.153.

(b) ¿Cómo utilizaría estos datos para argumentar que BtrI puede actuar como una proteína transportadora de acilo con CoA como grupo prostético?

De acuerdo con la terminología estándar, Li y colaboradores denominaron la proteína sin CoA apo-BtrI y la proteína con CoA (unida tal como se muestra en la Fig. 21–5) holo-BtrI. Cuando holo-BtrI se incubaba con glutamina, ATP y BtrJ purificada, la especie holo-BtrI de M_r 12.153 era sustituida por una especie de M_r 12.281, correspondiente al tioéster de glutamato y holo-BtrI. A partir de estos datos, los autores propusieron la siguiente estructura para la especie de M_r 12.281 (γ-glutamil-*S*-BtrI):



γ-Glutamil-*S*-BtrI

(c) ¿Qué otra(s) estructura(s) son compatibles con los datos anteriores?

(d) Li y colaboradores argumentaron que la estructura aquí mostrada (γ-glutamil-*S*-BtrI) probablemente fuese correcta porque el grupo α-carboxilo debía eliminarse en algún punto del proceso de síntesis. Explique la base química de esta argumentación (Pista: véase la Fig. 18–6c.)

La proteína BtrK mostró una homología considerable con las aminoácido descarboxilasas dependientes de PLP y la BtrK aislada de *E. coli* resultó contener PLP fuertemente unido. Cuando la γ-glutamil-*S*-BtrI se incubaba con BtrK purificada se obtenía una especie de M_r 12.240.

(e) ¿Cuál es la estructura más probable que presenta esta especie?

(f) Es destacable que cuando se incubaba glutamato y ATP con BtrI, BtrJ y BtrK se obtenía una especie de M_r 12.370. ¿Cuál es la estructura más probable de esta especie? Pista: recuerde que BtrJ puede usar ATP para γ-glutamilar grupos nucleofílicos.

Li y colaboradores encontraron que BtrO es homóloga de los enzimas monooxigenasa (véase el Recuadro 21–1) que hidroxilan los alcanos, con FMN como cofactor, y que BtrV es homóloga de una NAD(P)H oxidorreductasa. Otros dos genes del agrupamiento, *btrG* y *btrH*, probablemente codifiquen enzimas que eliminan el grupo γ-glutamilo y unen AHBA a la molécula diana de antibiótico.

(g) Sobre la base de estos datos, proponga una ruta plausible para la síntesis de AHBA y su unión a un antibiótico diana. Incluya los enzimas que catalizan cada etapa y cualesquiera sustratos o cofactores que sean necesarios.

Referencia

Li, Y., Llewellyn, N.M., Giri, R., Huang, F., & Spencer, J.B. (2005) Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein–mediated pathway. *Chem. Biol.* **12**, 665–675.

Reconocemos que cada tejido y, más generalmente, cada célula del organismo secreta... productos especiales o fermentos a la sangre que de este modo influyen sobre todas las demás células que así se integran entre ellas mediante un mecanismo diferente al del sistema nervioso.

—*Charles Édouard Brown-Séquard y J. d'Arsonval, artículo en* Comptes Rendus de la Société de Biologie, *1891*

23

Regulación hormonal e integración del metabolismo de los mamíferos

23.1 Hormonas: estructuras diversas para funciones diversas 901

23.2 Metabolismo específico de los tejidos: división del trabajo 912

23.3 Regulación hormonal del metabolismo energético 922

23.4 Obesidad y regulación de la masa corporal 930

23.5 Obesidad, síndrome metabólico y diabetes de tipo 2 938

Del capítulo 13 al 22 hemos revisado el metabolismo a nivel de la célula individual, haciendo hincapié en aquellas rutas metabólicas comunes a casi todas las células, bacterias, arqueas y eucariotas. Hemos visto de qué modo se regulan los procesos metabólicos celulares a nivel de reacciones enzimáticas individuales, mediante la disponibilidad de sustrato, los mecanismos alostéricos, la fosforilación u otras modificaciones covalentes de los enzimas.

Para entender plenamente el significado de las rutas metabólicas individuales y su regulación, debemos considerarlas en el contexto del conjunto del organismo. Una característica esencial de los organismos multicelulares es la diferenciación celular y la división del trabajo. Los tejidos y órganos de los organismos complejos, tales como los humanos, tienen funciones especializadas y, por lo tanto, tienen unos requerimientos energéticos y unos patrones metabólicos característicos. Las señales hormonales integran y coordinan las actividades metabólicas de los distintos tejidos, optimizando la distribución de precursores y sustratos energéticos entre los distintos órganos.

Este capítulo se ocupa del metabolismo especializado de los principales órganos y tejidos de los mamíferos y de la integración del metabolismo en el conjunto del organismo. Empezaremos examinando la amplia variedad de tipos de hormonas y de mecanismos hormonales para fijarnos seguidamente en las funciones específicas de tejido reguladas por estos mecanismos. Repasaremos la distribución de los nutrientes entre los distintos órganos, en la que el hígado juega un papel central, y la cooperación metabólica entre estos órganos. Para ilustrar el papel integrador de las hormonas describiremos la interrelación de la adrenalina, el glucagón y la insulina en la coordinación del metabolismo energético en el músculo, el hígado y el tejido adiposo. Los desarreglos metabólicos en la diabetes ilustran todavía con más claridad la importancia de la regulación hormonal del metabolismo. Examinaremos la regulación hormonal a largo plazo de la masa corporal y finalmente el papel de la obesidad en el desarrollo del síndrome metabólico y la diabetes.

23.1 Hormonas: estructuras diversas para funciones diversas

Prácticamente todos los procesos en los organismos complejos están regulados por una o más hormonas: el mantenimiento de la presión arterial, el volumen sanguíneo y el equilibrio de los electrolitos, la embriogénesis, la diferenciación sexual, el desarrollo y la reproducción, el hambre, los comportamientos alimenticios, la digestión y el suministro de combustibles, por citar unos pocos. Examinaremos aquí métodos para detectar y medir hormonas y las interacciones con sus receptores y describiremos una muestra representativa de tipos de hormonas.

La coordinación del metabolismo en los mamíferos corre a cargo del **sistema neuroendocrino.** Las células individuales de un tejido detectan un cambio en el entorno del organismo y

responden segregando un mensajero químico que pasa a otra célula del mismo o de un tejido diferente, donde se une a una molécula receptora y desencadena un cambio en la segunda célula. En la señalización neuronal **(Fig. 23–1a)**, el mensajero químico (un neurotransmisor; por ejemplo, acetilcolina) puede que viaje solamente una fracción de micrómetro a través de la hendidura sináptica hasta la siguiente neurona de la red. En la señalización hormonal, los mensajeros, las hormonas, son transportados por la sangre hasta células próximas o a órganos y tejidos distantes; pueden viajar más de un metro hasta hallar su célula diana (Fig 23–1b). Excepto por esta diferencia anatómica, estos dos sistemas de señalización química son muy parecidos. La adrenalina y la noradrenalina, por ejemplo, actúan como neurotransmisores en algunas sinapsis del cerebro y uniones neuromusculares del músculo liso, y también como hormonas que regulan el metabolismo energético en el hígado y en el músculo. En la siguiente discusión de la señalización celular haremos hincapié en la acción de las hormonas basándonos en los contenidos de metabolismo energético de capítulos anteriores, pero la mayoría de los mecanismos fundamentales que aquí se describen también están en la acción de los neurotransmisores.

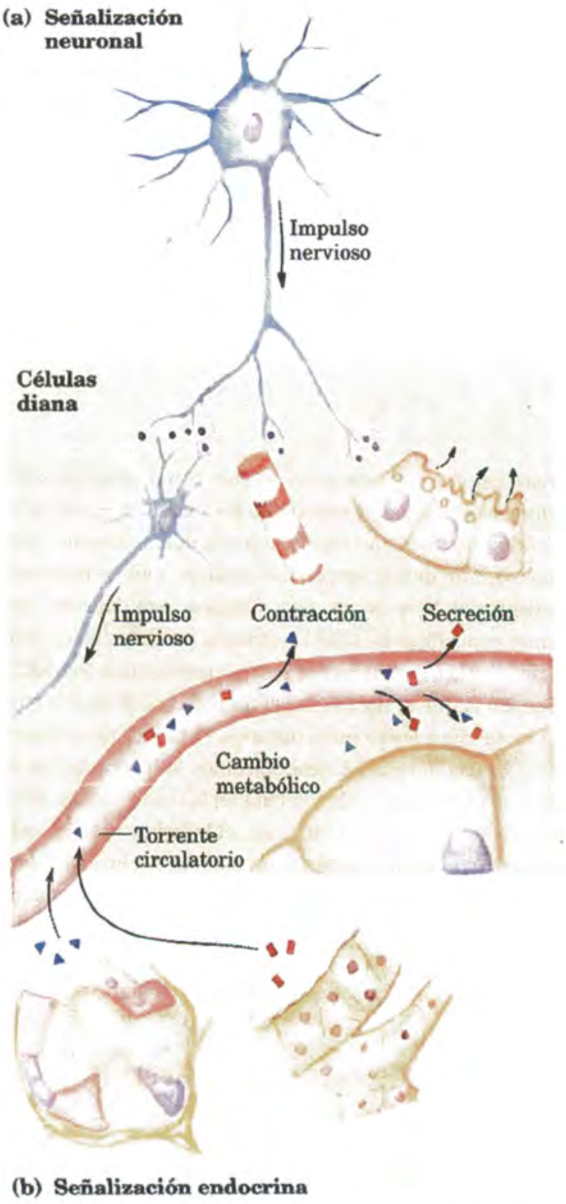


FIGURA 23–1 Señalización utilizada en el sistema neuroendocrino. (a) En la señalización neuronal, señales eléctricas (impulsos nerviosos) que se originan en el cuerpo celular de una neurona se transmiten rápidamente cubriendo largas distancias hasta el extremo del axón, en donde se liberan los neurotransmisores que difunden hasta la célula diana. La célula diana (otra neurona, un miocito o una célula secretora) se halla tan sólo a una fracción de micrómetro o a pocos micrómetros del sitio de liberación del neurotransmisor. **(b)** En el sistema endocrino, se secretan hormonas a la circulación sanguínea, que las transporta a través del cuerpo hasta los tejidos diana, que pueden hallarse a más de un metro de distancia de la célula secretora. Tanto los neurotransmisores como las hormonas interaccionan con receptores específicos que se encuentran en la superficie o en el interior de la célula diana, desencadenando respuestas.

La detección y la purificación de las hormonas requieren un bioensayo

¿Cómo se detecta y aisla una hormona? En primer lugar hay que identificar un proceso fisiológico en un tejido que dependa de una señal originada en otro tejido. La insulina, por ejemplo, fue identificada como una sustancia producida en el páncreas que afectaba el volumen y la composición de la orina (Recuadro 23–1). Una vez se ha descubierto el efecto fisiológico de una supuesta hormona, es posible desarrollar un ensayo biológico cuantitativo para la hormona. En el caso de la insulina, el ensayo consistió en inyectar extractos de páncreas (una fuente cruda de insulina) en animales de experimentación deficientes en insulina, cuantificándose a continuación los cambios resultantes en la concentración de glucosa en sangre y en orina. Para aislar una hormona, se fraccionan extractos que contienen la supuesta hormona con las mismas técnicas usadas en la purificación de otras biomoléculas (fraccionamiento con disolventes, cromatografía y electroforesis) y se analiza la actividad hormonal en cada fracción. Una vez se ha purificado el material, es posible determinar su composición química y su estructura.

Este procedimiento para la caracterización de las hormonas es engañosamente sencillo. Las hormonas son tan potentes que es necesario producirlas sólo en muy pequeñas cantidades. La obtención de suficiente hormona para permitir su caracterización química a menudo implica el aislamiento bioquímico a gran escala. Cuando Andrew Schally y Roger Guillemin purificaron y caracterizaron independientemente la hormona liberadora de la tirotropina (TRH) del hipotálamo, el grupo de Schally procesó unas veinte toneladas de hipotálamos obtenidos de cerca de dos millones de ovejas, mientras que el grupo de Guillemin extrajo los hipotálamos de un millón de cerdos. La TRH resultó ser un simple derivado del tripéptido Glu–His–Pro **(Fig. 23–2)**. Una vez se conoció la estructura de la hormona, pudo ser sintetizada químicamente en grandes cantidades para ser usada en estudios fisiológicos y bioquímicos.

Por su trabajo sobre las hormonas hipotalámicas, Schally y Guillemin compartieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1977 junto con Rosalyn Yalow, quien (con Solomon A. Berson) desarrolló el extraordinariamente sensible **radioinmunoensayo (RIA)** para hormonas peptídicas y el estudio de la acción hormonal. El RIA revolucionó la investigación de las hormonas al hacer posible la medida rápida, cuantitativa y específica de muy pequeñas cantidades de hormonas.

RECUADRO 23–1 MEDICINA

¿Cómo se descubre una hormona? El difícil camino hasta la insulina purificada

Millones de personas que sufren diabetes mellitus de tipo 1 (dependiente de insulina) se inyectan diariamente insulina pura para compensar que sus propias células β pancreáticas no la produzcan. La inyección de insulina no cura la diabetes, pero permite que personas que de otro modo habrían muerto jóvenes puedan desarrollar vidas largas y productivas. El descubrimiento de la insulina, que tuvo su origen en una observación absolutamente casual, ilustra la combinación de buena suerte y cuidadosa experimentación que ha permitido el descubrimiento de un gran número de hormonas.

En el año 1889, Oscar Minkowsky, un joven asistente de la Facultad de Medicina de Estrasburgo, y Josef von Mering, del Instituto Hoppe-Seyler también de Estrasburgo, tuvieron una disputa amistosa acerca de si el páncreas, cuyo contenido en lipasas era conocido, era importante en la digestión de las grasas en el perro.

Para resolver el tema emprendieron un experimento sobre la digestión de las grasas. Extirparon quirúrgicamente el páncreas de un perro, pero antes de que el experimento fuese más adelante Minkowsky observó que el perro producía mucha más orina de la normal (un síntoma común de la diabetes no tratada). La orina del perro también tenía niveles de glucosa muy por encima de los normales (otro síntoma de la diabetes). Todos estos hallazgos sugerían que la falta de algún producto pancreático provocaba la diabetes.

Minkowsky trató sin éxito de preparar un extracto de páncreas de perro que invirtiera el efecto de eliminar el páncreas; es decir, disminuir los niveles de glucosa en la orina y en la sangre. Gracias a investigaciones posteriores, en la actualidad sabemos que la insulina es una proteína y que el páncreas es muy rico en proteasas (tripsina y quimotripsina), que son liberadas directamente en el intestino delgado para ayudar a la digestión. Estas proteasas sin duda degradaron la insulina en los extractos pancreáticos de Minkowsky.

A pesar de esfuerzos considerables, no se realizó ningún progreso en el aislamiento o en la caracterización del "factor antidiabético" hasta el verano de 1921, cuando Frederick G. Banting, un joven científico que trabajaba en el laboratorio de J. J. R. MacLeod en la Universidad de Toronto, y un estudiante, Charles Best, decidieron afrontar el problema. Por aquel entonces, diferentes indicios señalaban a un grupo de células especializadas del páncreas (los islotes de Langerhans, véase la Fig. 23–27) como la fuente del factor antidiabético, que por ello recibió la denominación de insulina (del latín *insula*, "isla").

Tomando las precauciones oportunas para evitar la proteólisis, Banting y Best (más tarde ayudados por el bioquímico J. B. Collip) lograron preparar en diciembre de 1921 un extracto pancreático purificado que curaba los síntomas de la diabetes experimental en los perros.

El 25 de enero de 1922 (¡sólo un mes más tarde!) su preparación de insulina fue inyectada a Leonard Thompson, un muchacho de 14 años gravemente enfermo de diabetes mellitus. En pocos días, efectivamente, los niveles de cuerpos cetónicos y de glucosa en la orina de Thompson descendieron notablemente; el extracto pancreático le salvó la vida. En 1923, Banting y MacLeod ganaron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por el aislamiento de la insulina. Banting anunció inmediatamente que compartiría su premio con Best; MacLeod compartió el suyo con Collip.

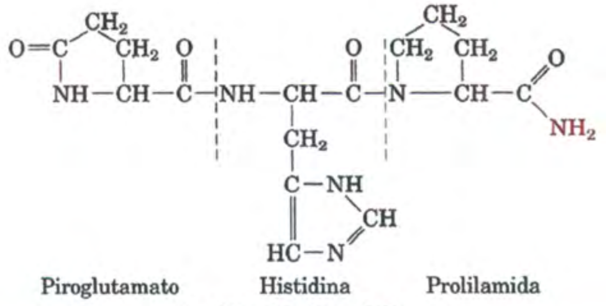
Ya en el año 1923, las compañías farmacéuticas suministraban insulina extraída de páncreas porcino a miles de pacientes de todo el mundo que sufren diabetes. Con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética en la década de 1980 (véase el Capítulo 9), fue posible producir cantidades ilimitadas de insulina humana, introduciendo el gen clonado de la insulina humana en un microorganismo cultivable a escala industrial. Actualmente algunos pacientes llevan implantadas bombas de insulina que liberan cantidades de insulina variables, de acuerdo con las necesidades en las comidas y durante el ejercicio. Existen perspectivas razonables de que en un futuro no demasiado lejano el trasplante de tejido pancreático provea a los pacientes diabéticos de una fuente de insulina que responda como un páncreas normal, es decir, liberando insulina sólo cuando aumente la glucosa sanguínea.

Frederick G. Banting, 1891–1941

J. J. R. MacLeod, 1876–1935

Charles Best, 1899–1978

J. B. Collip, 1892–1965



piroGlu–His–Pro–NH_2

FIGURA 23–2 Estructura de la hormona liberadora de la tirotropina (TRH). Purificada después de esfuerzos heroicos a partir de extractos de hipotálamo, la TRH resultó ser un derivado del tripéptido Glu–His–Pro. El grupo carboxilo de la cadena lateral del Glu amino-terminal forma una amida (enlace en rojo) con el grupo α-amino del residuo, formándose un piroglutamato; el grupo carboxilo de la Pro carboxi-terminal se convierte en una amida (—NH_2 en rojo). Tales modificaciones son comunes entre los péptidos hormonales pequeños. En una proteína típica de $M_r \sim 50.000$, las cargas en los residuos amino- y carboxi-terminales contribuyen relativamente poco a la carga global de la proteína, pero en un tripéptido estas dos cargas dominan las propiedades de la molécula. La formación de los derivados amida elimina estas cargas.

Andrew V. Schally

Roger Guillemin

Rosalyn S. Yalow

Los anticuerpos específicos de las hormonas son la clave del radioinmunoensayo. La hormona purificada inyectada a conejos estimula la síntesis de anticuerpos que se unen a la hormona con gran afinidad y especificidad. Cuando una cantidad constante de anticuerpo aislado se incuba con una cantidad fija de hormona marcada con radiactividad, una cierta fracción de hormona radiactiva se une al anticuerpo **(Fig. 23–3)**. Si además de la hormona marcada radiactivamente también está presente la hormona no marcada, la hormona no marcada competirá con la hormona marcada por la unión al sitio de fijación del anticuerpo, desplazándola en parte de su lugar de unión al anticuerpo. Esta competición por la unión puede ser cuantificada mediante una curva estándar de referencia con cantidades conocidas de hormona no marcada. El grado de desplazamiento de la hormona marcada de la unión con el anticuerpo es una medida de la cantidad de hormona (no marcada) en una muestra de sangre o extracto tisular. El uso de hormona muy radiactiva hace posible la detección de unos pocos picogramos de hormona en una muestra. Una modalidad más moderna de esta técnica, denominada ensayo del inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), se muestra en la Figura 5–26b.

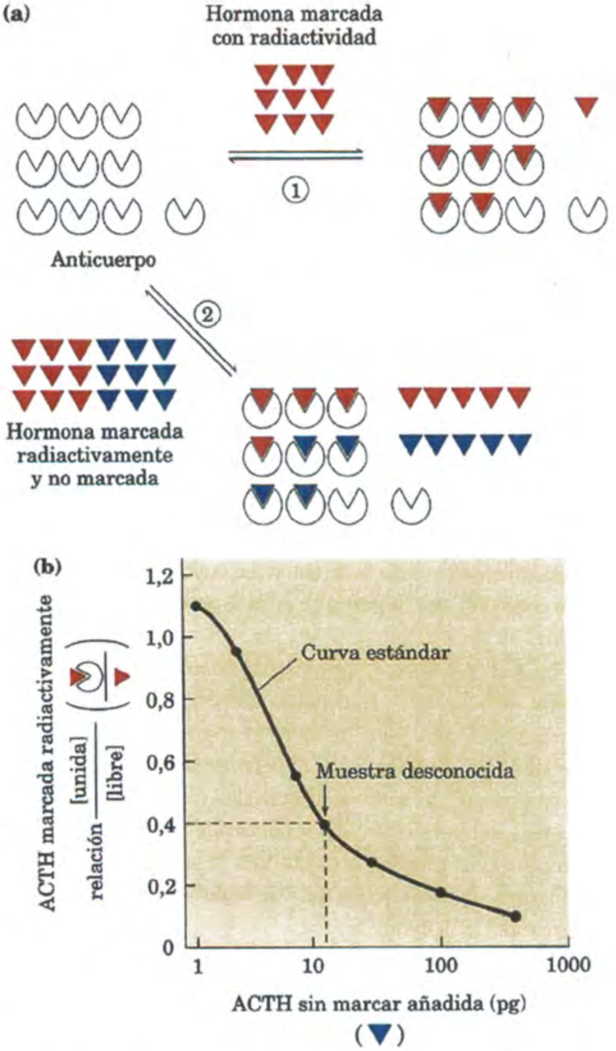


FIGURA 23–3 Radioinmunoensayo (RIA). (a) Se incuba una pequeña cantidad de hormona marcada con radiactividad (rojo) con ① una cantidad fija de anticuerpo específico para la hormona, o ② una cantidad fija de anticuerpo y varias concentraciones de hormona no marcada (azul). En el segundo caso las moléculas de hormona no marcadas compiten con las marcadas por la unión al anticuerpo; la cantidad de hormona marcada unida varía inversamente con la concentración de hormona no marcada presente. **(b)** Radioinmunoensayo de la hormona adrenocorticotropa (ACTH; también llamada corticotropina). Se confecciona una curva estándar de la relación [ACTH marcada unida]/[ACTH marcada no unida] frente a [ACTH no marcada añadida] (a escala logarítmica) para determinar la cantidad de ACTH (no marcada) que hay en una muestra desconocida. Si una alícuota que contiene una cantidad desconocida de hormona da un valor de, por ejemplo, 0,4 para la relación [unida]/[libre] (véase la flecha), la alícuota debe contener unos 20 pg de ACTH.

Las hormonas actúan a través de receptores celulares de elevada afinidad

En el Capítulo 12 vimos que todas las hormonas actúan a través de receptores muy específicos, presentes en las células diana sensibles a las hormonas, a los que éstas se unen con elevada afinidad (véase la Fig. 12–1a). Cada tipo celular tiene su propio

surtido de receptores hormonales, que definen la gama de su respuesta hormonal. Además, dos tipos celulares con el mismo tipo de receptor pueden tener distintas dianas intracelulares de acción hormonal y por lo tanto pueden responder de forma distinta a la misma hormona. La especificidad de la acción hormonal es consecuencia de la complementariedad estructural entre la hormona y su receptor; esta interacción es extremadamente selectiva, lo que permite que hormonas estructuralmente similares tengan efectos diferentes. La elevada afinidad de la interacción hace posible que las células respondan a concentraciones muy bajas de hormonas. En el diseño de fármacos dirigidos a influir en la regulación hormonal es necesario conocer la especificidad relativa y la afinidad del fármaco y de la hormona natural. Recuerde que la interacción hormona-receptor puede ser cuantificada por el **análisis de Scatchard** (véase el Recuadro 12–1), que en condiciones favorables suministra una medida cuantitativa de la afinidad (la constante de disociación del complejo) y el número de sitios de unión para la hormona en una preparación de receptor.

El lugar de encuentro entre la hormona y su receptor puede ser extracelular, citosólico o nuclear, según el tipo de hormona. Las consecuencias intracelulares de la interacción receptor-hormona son de al menos seis tipos generales: (1) un segundo mensajero (tal como el cAMP o el inositol trisfosfato) generado en el interior de la célula actúa como regulador alostérico de uno o varios enzimas; (2) un receptor tirosina quinasa es activado por la hormona extracelular; (3) un receptor guanilil ciclasa es activado y produce el segundo mensajero cGMP; (4) un cambio del potencial de membrana resultante de la apertura o del cierre de un canal iónico regulado por hormonas; (5) un receptor de adhesión en la superficie celular interacciona con moléculas de la matriz extracelular pasando información al citoesqueleto, o (6) una molécula esteroidea o de tipo esteroide produce un cambio en el nivel de expresión (transcripción del DNA en mRNA) de uno o de varios genes, facilitado por un receptor hormonal nuclear proteico (véase la Fig. 12–2).

Las hormonas peptídicas y de tipo amina hidrosolubles (insulina y adrenalina, por ejemplo), actúan extracelularmente uniéndose a receptores de la superficie celular que abarcan el espesor de la membrana plasmática **(Fig. 23–4)**. Cuando la hormona se une al dominio extracelular, el receptor experimenta un cambio de conformación análogo al producido por la unión de una molécula efectora a un enzima alostérico. El cambio de conformación desencadena los efectos ulteriores de las hormonas.

Una única molécula de hormona, al formar un complejo hormona-receptor, activa un catalizador que produce muchas moléculas de segundo mensajero, de manera que el receptor sirve no sólo de transductor de señales, sino también de amplificador de señales. La señal puede amplificarse aún más a través de una cascada de señalización, una serie de pasos en cada uno de los cuales un catalizador activa a otro catalizador, con el resultado de una gran amplificación de la señal original. Una cascada de este tipo tiene lugar en la regulación de la síntesis y degradación del glucógeno por la adrenalina (véase la Fig. 12–7). La adrenalina activa (a través de su receptor) a la adenilil ciclasa, que produce muchas moléculas de cAMP por cada molécula de hormona unida a su receptor. El cAMP, a su vez, activa a la proteína quinasa dependiente de cAMP (proteína quinasa A), que activa a la glucógeno fosforilasa *b* quinasa, que activa a la glúcogeno fosforilasa *b*. El resultado es la amplificación de la señal: una molécula de adrenalina da lugar a la producción de muchos miles de moléculas de glucosa 1-fosfato a partir de glucógeno.

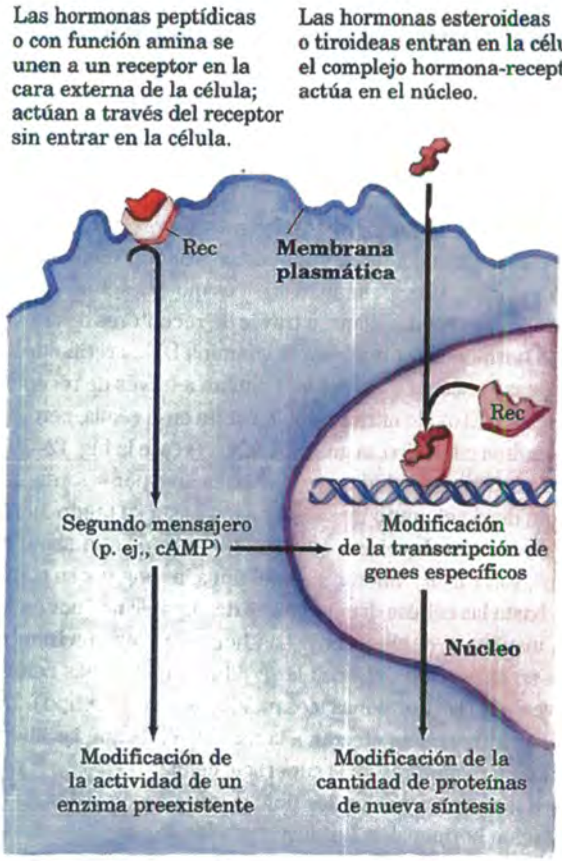


FIGURA 23–4 Dos mecanismos generales de acción hormonal. Las hormonas peptídicas y las aminadas actúan más rápidamente que las hormonas esteroideas y tiroideas.

Las hormonas insolubles en agua (hormonas esteroides, retinoides y tiroideas) pasan fácilmente a través de la membrana plasmática de sus células diana para alcanzar sus proteínas receptoras en el núcleo (Fig. 23–4). En esta clase de hormonas, el mensaje es transportado por el propio complejo hormona-receptor, que interacciona con el DNA, alterando la expresión de genes específicos, que redunda en un cambio del complemento enzimático de la célula y, por tanto, de su metabolismo celular (véase la Fig. 12–29).

Las hormonas que actúan a través de receptores de la membrana plasmática desencadenan respuestas fisiológicas o bioquímicas muy rápidas. Sólo segundos después de que la adrenalina sea segregada en la sangre por la médula suprarrenal, el músculo esquelético responde acelerando la degradación del glucógeno. Por el contrario, las hormonas tiroideas y las hormonas sexuales (esteroides) promueven la respuesta máxima en los tejidos diana sólo al cabo de horas o incluso días. Estas diferencias en el tiempo de respuesta corresponden a diferentes modos de acción. En general, las hormonas de acción rápida modifican la actividad de uno o más enzimas preexistentes en la célula a través de mecanismos alostéricos o por modificación covalente. Las de acción lenta generalmente alteran la expre-

sión génica, lo que da como resultado una mayor (regulación hacia arriba o "upregulation") o menor (regulación hacia abajo o "downregulation") síntesis de las proteínas sujetas a regulación.

Las hormonas son químicamente diversas

Hay varias clases de hormonas en los mamíferos, distinguibles por sus estructuras químicas y modos de acción (Tabla 23–1). Las hormonas peptídicas, aminadas e icosanoides actúan desde el exterior de las células diana, a través de receptores de superficie. Las hormonas esteroideas, la vitamina D, los retinoides y las tiroideas penetran en la célula y actúan a través de receptores nucleares. El óxido nítrico también entra en la célula, pero activa un enzima citosólico, la guanilil ciclasa (véase la Fig. 12–20).

Las hormonas también pueden clasificarse por la forma como viajan desde el punto de su liberación hasta su tejido diana. Las hormonas **endocrinas** (del griego *endon*, que significa "dentro", y *krinein*, "liberar") se liberan a la sangre y se transportan hasta las células diana a través del organismo (por ejemplo, la insulina y el glucagón). Las hormonas **paracrinas** se liberan en el espacio extracelular y difunden hacia las células diana vecinas (las hormonas icosanoides son de este tipo). Las hormonas **autocrinas** afectan a la misma célula que las libera, uniéndose a receptores de la superficie celular.

Los mamíferos no son los únicos que poseen sistemas de señalización hormonales. Los insectos y los gusanos nemátodos tienen sistemas de regulación hormonal muy desarrollados, cuyos mecanismos fundamentales son similares a los de los mamíferos. Las plantas también utilizan señales hormonales para coordinar las actividades de sus diversos tejidos (Capítulo 12). El estudio de la acción hormonal en las plantas no está tan avanzado como en los animales, pero está claro que tienen en común algunos mecanismos.

Para ilustrar la diversidad estructural y el abanico de efectos de las hormonas de los mamíferos, consideremos algunos ejemplos representativos de cada una de las clases principales que se muestran en la Tabla 23–1.

Hormonas peptídicas Las hormonas peptídicas pueden tener desde 3 a más de 200 residuos aminoácidos. Incluyen las hormonas pancreáticas insulina, glucagón y somatostatina, la hormona paratiroidea calcitonina y todas las hormonas del hipotálamo y la hipófisis (descritas más adelante). Estas hormonas se sintetizan en los ribosomas como proteínas precursoras más largas (prohormonas), se empaquetan en vesículas secretoras y se escinden por proteólisis para formar los péptidos activos. La **insulina** es una proteína pequeña (M_r 5.800) con dos cadenas polipeptídicas, A y B, unidas por dos puentes disulfuro. Se sintetiza en el páncreas en forma de precursor inactivo de una sola cadena polipeptídica, la preproinsulina **(Fig. 23–5)**, con una "secuencia señal" amino-terminal, que determina su incorporación a vesículas secretoras. (Las secuencias señal se discuten en el Capítulo 27; véase la Fig. 27–38.) La eliminación proteolítica de la secuencia señal y la formación de tres puentes disulfuro produce la proinsulina, que se almacena en gránulos de secreción en las células β pancreáticas. Cuando el aumento de la glucosa en sangre es suficiente para desencadenar la secreción de insulina, la proinsulina se convierte en insulina activa por proteasas específicas, que cortan dos enlaces peptídicos para formar la molécula de insulina madura.

En algunos casos, las proteínas prohormonas dan lugar a una sola hormona peptídica, pero a menudo se obtienen varias hormonas activas a partir de la misma prohormona. La proopiomelanocortina (POMC) es un ejemplo espectacular de codificación de múltiples hormonas por un solo gen. El gen de la POMC codifica un gran polipéptido que se corta progresivamente en al menos nueve péptidos biológicamente activos **(Fig. 23–6)**. Los residuos terminales de las hormonas peptídicas están a menudo modificados, como en la TRH (Fig. 23–2).

La concentración de las hormonas peptídicas en el interior de los gránulos de secreción es tan alta que el contenido es virtualmente cristalino; cuando el contenido de un gránulo es liberado por exocitosis, se libera súbitamente una gran cantidad de hormona. Los capilares que irrigan las glándulas endocrinas sintetizadoras de péptidos hormonales aumentan su permeabilidad a los péptidos, de manera que las hormonas secretadas pueden llegar fácilmente al torrente circulatorio para su transporte hasta las células diana alejadas. Tal como se indicó anteriormente, todas las hormonas peptídicas actúan mediante la unión a receptores de la membrana plasmática. Provocan la producción de un segundo mensajero en el citosol, que cambia la actividad de un enzima intracelular, modificando así el metabolismo celular.

TABLA 23–1 Clases de hormonas

Tipo	Ejemplo	Vía de síntesis	Modo de acción
Péptido	Insulina, glucagón	Modificación proteolítica de una prohormona	Receptores de la membrana plasmática; segundos mensajeros
Catecolamina	Adrenalina	De la tirosina	
Icosanoide	PGE_1	Del araquidonato (ácido graso 20:4)	
Esteroide	Testosterona	Del colesterol	Receptores nucleares; regulación de la transcripción
Vitamina D	1,25-dihidroxicolecalciferol	Del colesterol	
Retinoide	Ácido retinoico	De la vitamina A	
Tiroides	Triyodotironina (T_3)	De la Tyr de la tiroglobulina	
Óxido nítrico	Óxido nítrico	De arginina + O_2	Receptor citosólico (guanilato ciclasa) y segundo mensajero (cGMP)

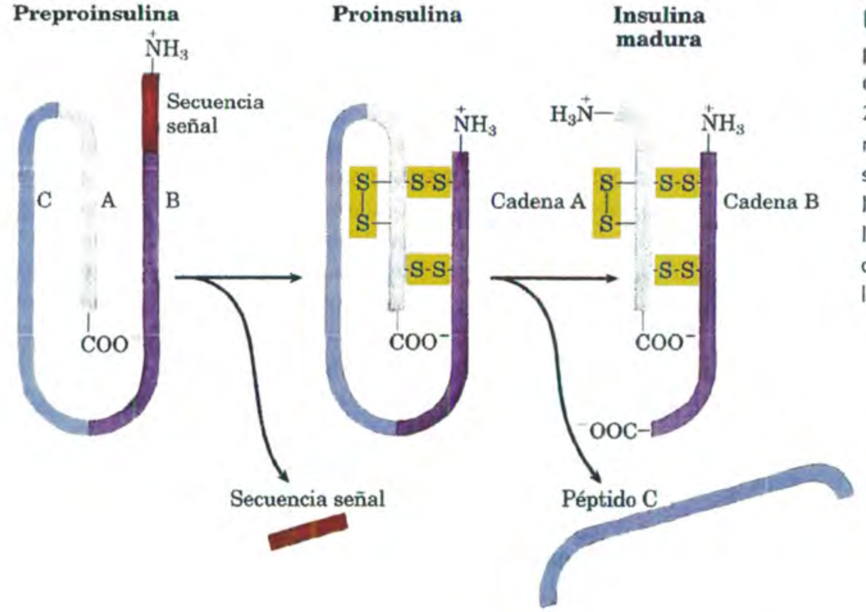


FIGURA 23–5 La insulina. La insulina madura se forma a partir de un precursor más largo, la preproinsulina, por modificación proteolítica. La eliminación de un segmento de 23 aminoácidos (la secuencia señal) del extremo amino-terminal de la preproinsulina y la formación de tres puentes disulfuro dan lugar a la proinsulina. Posteriores cortes proteolíticos eliminan el péptido C de la proinsulina, para producir la insulina madura, compuesta por las cadenas A y B. La secuencia de aminoácidos de la insulina bovina se muestra en la Figura 3–24.

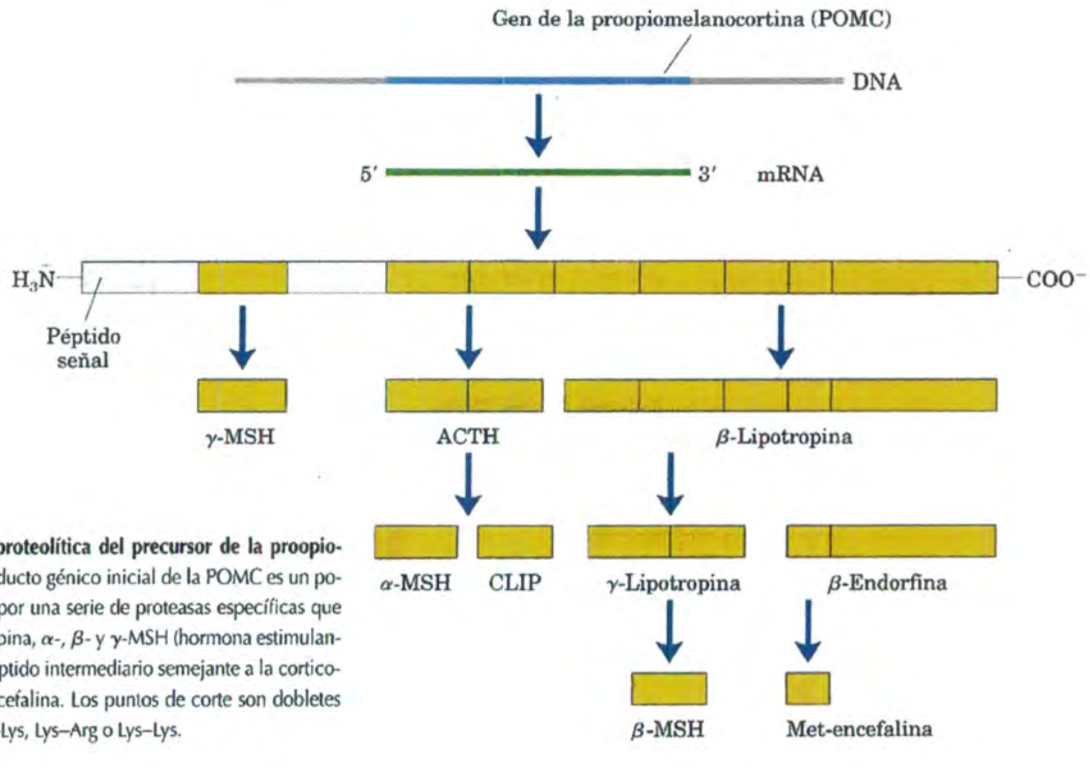


FIGURA 23–6 Modificación proteolítica del precursor de la proopiomelanocortina (POMC). El producto génico inicial de la POMC es un polipéptido largo que es cortado por una serie de proteasas específicas que producen ACTH, β- y γ-lipotropina, α-, β- y γ-MSH (hormona estimulante de los melanocitos), CLIP (péptido intermediario semejante a la corticotropina), β-endorfina y Met-encefalina. Los puntos de corte son dobletes de residuos básicos, como Arg–Lys, Lys–Arg o Lys–Lys.

Hormonas catecolaminas Los compuestos hidrosolubles **adrenalina (epinefrina)** y **noradrenalina (norepinefrina)** son **catecolaminas,** sintetizadas a partir de tirosina y denominadas así por su relación con el catecol.

$$\text{Tirosina} \longrightarrow \text{L-Dopa} \longrightarrow \text{Dopamina} \longrightarrow \text{Noradrenalina} \longrightarrow \text{Adrenalina}$$

Las catecolaminas sintetizadas en el cerebro y otros tejidos nerviosos actúan como neurotransmisores, pero la adrenalina y la noradrenalina también se sintetizan y secretan como hormonas por las glándulas suprarrenales. Del mismo modo que las hormonas peptídicas, las catecolaminas se encuentran muy concentradas en el interior de vesículas de secreción, se liberan por exocitosis y actúan a través de receptores de superficie para generar segundos mensajeros. Intervienen en una gran variedad de respuestas fisiológicas frente al estrés agudo (véase la Tabla 23–6).

Hormonas icosanoides Las hormonas icosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) proceden del araquidonato, un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos.

Fosfolípidos
↓
Araquidonato
(20:4)
↓
Prostaglandinas | Tromboxanos | Leucotrienos

A diferencia de las hormonas descritas hasta el momento, no se sintetizan con antelación ni se almacenan; se producen cuando se necesitan a partir del araquidonato que ha sido liberado enzimáticamente de los fosfolípidos de la membrana por la fosfolipasa A_2. Los enzimas de la vía de las prostaglandinas y los tromboxanos (véase la Fig. 21–15) están ampliamente distribuidos en los tejidos de los mamíferos; la mayoría de las células pueden producir estas señales, y las células de muchos tejidos pueden responder a través de receptores específicos de la membrana plasmática. Las hormonas icosanoides son hormonas paracrinas secretadas en el fluido intersticial (sin preferencia por la sangre) y actúan sobre las células vecinas.

Las prostaglandinas estimulan la contracción del músculo liso, incluidos el del intestino y del útero (y pueden, por lo tanto, ser usadas para inducir el parto). También están implicadas en el dolor y la inflamación en todos los tejidos. Muchos fármacos de acción antiinflamatoria actúan inhibiendo pasos de la vía de síntesis de las prostaglandinas (véase la Fig. 21–15). Los tromboxanos regulan la función de las plaquetas y, por lo tanto, la coagulación sanguínea. Los leucotrienos LTC_4 y LTD_4 actúan a través de receptores de la membrana plasmática estimulando la contracción del músculo liso en el intestino, las vías pulmonares y la tráquea, y son mediadores de la severa respuesta inmune denominada anafilaxia. ■

Hormonas esteroideas Las hormonas esteroideas (hormonas adrenocorticales y hormonas sexuales) se sintetizan a partir del colesterol en varios tejidos endocrinos.

Colesterol
↓
Progesterona
↓
Cortisol (glucocorticoide) | Aldosterona (mineralocorticoide) | Testosterona → Estradiol (hormonas sexuales)

Son transportadas hasta sus células diana a través del torrente circulatorio, unidas a proteínas transportadoras. En el córtex suprarrenal se producen más de 50 hormonas corticosteroides mediante reacciones que eliminan la cadena lateral del anillo D del colesterol e introducen oxígeno para formar grupos ceto e hidroxilo. En muchas de estas reacciones intervienen enzimas con citocromo P-450 (véase el Recuadro 21–1). Las hormonas esteroideas son de dos tipos generales. Los glucocorticoides (tales como el cortisol) afectan principalmente el metabolismo de los glúcidos; los mineralocorticoides (tales como la aldosterona) regulan las concentraciones de electrolitos en la sangre. Los andrógenos (testosterona) y los estrógenos (tales como el estradiol; véase la Fig. 10–19) se sintetizan en los testículos y en los ovarios. Su síntesis también emplea enzimas con citocromo P-450, que cortan la cadena lateral del colesterol e introducen átomos de oxígeno. Estas hormonas afectan el desarrollo sexual, el comportamiento sexual y otras funciones reproductivas y no reproductivas.

Todas las hormonas esteroideas actúan a través de receptores nucleares para cambiar el nivel de expresión de genes específicos (p. 456). También tienen efectos más rápidos facilitados por receptores localizados en la membrana plasmática.

Hormona de la vitamina D El calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol) se obtiene a partir de la vitamina D por reacciones de hidroxilación enzimáticas en el hígado y los riñones (véase la Fig. 10–20a). La vitamina D se obtiene de la dieta o por fotólisis del 7-deshidrocolesterol en la piel expuesta a la luz solar.

7-Deshidrocolesterol
↓ luz UV
Vitamina D_3
(colecalciferol)
↓
25-Hidroxicolecalciferol
↓
1,25-Dihidroxicolecalciferol

El calcitriol actúa de forma concertada con la hormona paratiroidea en la homeostasis del Ca^{2+}, regulando la concentración de Ca^{2+} en la sangre y el equilibrio entre deposición y movilización de Ca^{2+} en el hueso. A través de receptores nucleares, el calcitriol activa la síntesis de una proteína intestinal de unión de calcio, esencial para la asimilación del Ca^{2+} de la dieta. La ingesta insuficiente de vitamina D o defectos en la biosíntesis de calcitriol producen enfermedades graves tales como el raquitismo, en la que los huesos son débiles y están mal formados (véase la Fig. 10–20b). ■

Hormonas retinoides Los retinoides son potentes hormonas que regulan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular mediante los receptores nucleares de los retinoides. La prohormona retinol se sintetiza principalmente en el hígado a partir del β-caroteno (véase la Fig. 10–21), y muchos tejidos convierten el retinol en la hormona ácido retinoico (RA).

β-Caroteno
↓
Vitamina A_1
(retinol)
↓
Ácido retinoico

Los retinoides actúan sobre todos los tejidos, pues todos los tipos de células tienen al menos una forma de receptor nuclear de los retinoides. En los adultos, la córnea, la piel, los epitelios del pulmón y de la tráquea y el sistema inmunitario se encuentran entre las dianas principales. El RA regula la síntesis de proteínas esenciales para el crecimiento y la diferenciación. Un exceso de vitamina A puede producir malformaciones congénitas, por lo que se recomienda a las mujeres embarazadas que no utilicen las cremas a base de retinoides desarrolladas para el tratamiento del acné grave. ■

Hormonas tiroideas Las hormonas tiroideas T_4 (tiroxina) y T_3 (triyodotironina) se sintetizan a partir de la proteína precursora tiroglobulina (M_r 660.000). Hasta 20 residuos Tyr de la tiroglobulina se yodan enzimáticamente en la glándula tiroides. A continuación se condensan dos residuos yodotirosina para formar el precursor de la tiroxina. Cuando se necesita la tiroxina se libera por proteólisis. La condensación de monoyodotirosina con diyodotirosina produce T_3, que también es una hormona activa liberada por proteólisis.

Tiroglobulina–Tyr

↓

Tiroglobulina–Tyr-I
(residuos Tyr yodados)

↓ proteólisis

Tiroxina (T_4),
triyodotironina (T_3)

Las hormonas tiroideas actúan a través de receptores nucleares que estimulan el metabolismo energético, especialmente en el hígado y el músculo, a través del incremento de la expresión de genes que codifican enzimas clave del catabolismo.

Óxido nítrico (NO) El óxido nítrico es un radical libre relativamente estable que se sintetiza a partir de oxígeno molecular y del nitrógeno del grupo guanidinio de la arginina (véase la Fig. 22–31) en una reacción catalizada por la **NO sintasa.**

$$\text{Arginina} + 1\tfrac{1}{2}\,\text{NADPH} + 2O_2 \longrightarrow \text{NO} + \text{citrulina} + 2H_2O + 1\tfrac{1}{2}\,\text{NADP}^+$$

Este enzima se encuentra en muchos tejidos y tipos celulares: neuronas, macrófagos, hepatocitos, miocitos del músculo liso, células endoteliales de los vasos sanguíneos y células epiteliales del riñón. El NO actúa cerca de su lugar de liberación, penetra en la célula diana y activa el enzima citosólico guanilil ciclasa, que cataliza la formación del segundo mensajero cGMP (véase la Fig. 12–20).

La liberación de hormonas está regulada por señales neuronales y hormonales jerarquizadas

Los niveles variables de hormonas específicas regulan procesos celulares específicos, pero ¿qué regula el nivel de cada hormona? Una respuesta breve es que el sistema nervioso central recibe señales de muchos sensores internos y externos (señales de peligro, hambre, ingesta alimenticia, composición y presión de la sangre, por ejemplo) y orquesta la producción de señales hormonales apropiadas por los tejidos endocrinos. Para una respuesta más completa, es necesario considerar los sistemas de producción de hormonas del cuerpo humano y algunas de sus interacciones funcionales.

La **Figura 23–7** muestra la localización anatómica de las principales glándulas endocrinas de los humanos, y la **Figura 23–8** representa el "escalafón" de la jerarquía de señalización hormonal. El **hipotálamo,** una pequeña región del cerebro **(Fig. 23–9)**, es el centro de coordinación del sistema endocrino; recibe e integra mensajes procedentes del sistema nervioso central. En respuesta a estos mensajes, el hipotálamo produce hormonas reguladoras (factores de liberación) que pasan directamente a la glándula hipófisis colindante a través de vasos sanguíneos y neuronas especiales que conectan las dos glándulas (Fig. 23–9b). La hipófisis tiene dos partes funcionalmente distintas. La **hipófisis posterior** contiene los extremos de los axones de muchas neuronas que se originan en el hipotálamo. Estas neuronas producen los pequeños péptidos con función hormonal vasopresina y oxitocina **(Fig. 23–10)**, que se desplazan por el axón hasta los extremos de los terminales nerviosos en la hipófisis, en donde son almacenados en gránulos de secreción en espera de la señal para su liberación.

La **hipófisis anterior** responde a las hormonas hipotalámicas transportadas por la sangre produciendo **hormonas trópicas** o **tropinas** (del griego *tropos*, que significa "vuelta"). Estos polipéptidos relativamente largos activan el siguiente nivel de glándulas endocrinas (Fig. 23–8), entre las que se encuentran la corteza suprarrenal, la glándula tiroides, los ovarios y los testículos. Estas glándulas, a su vez, secretan sus hormonas específicas, que se transportan por la sangre hasta los tejidos diana. Por ejemplo, la hormona liberadora de la corti-

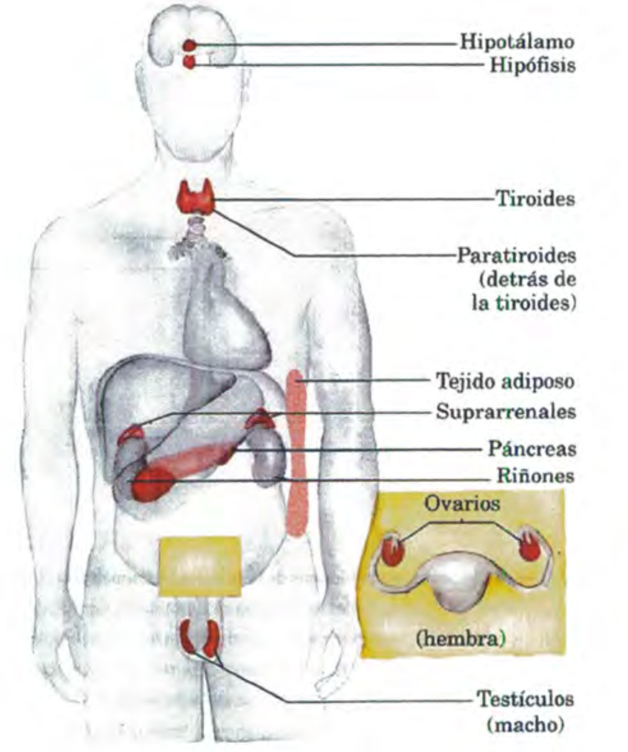


FIGURA 23–7 Principales glándulas endocrinas. Las glándulas están sombreadas en rosa.

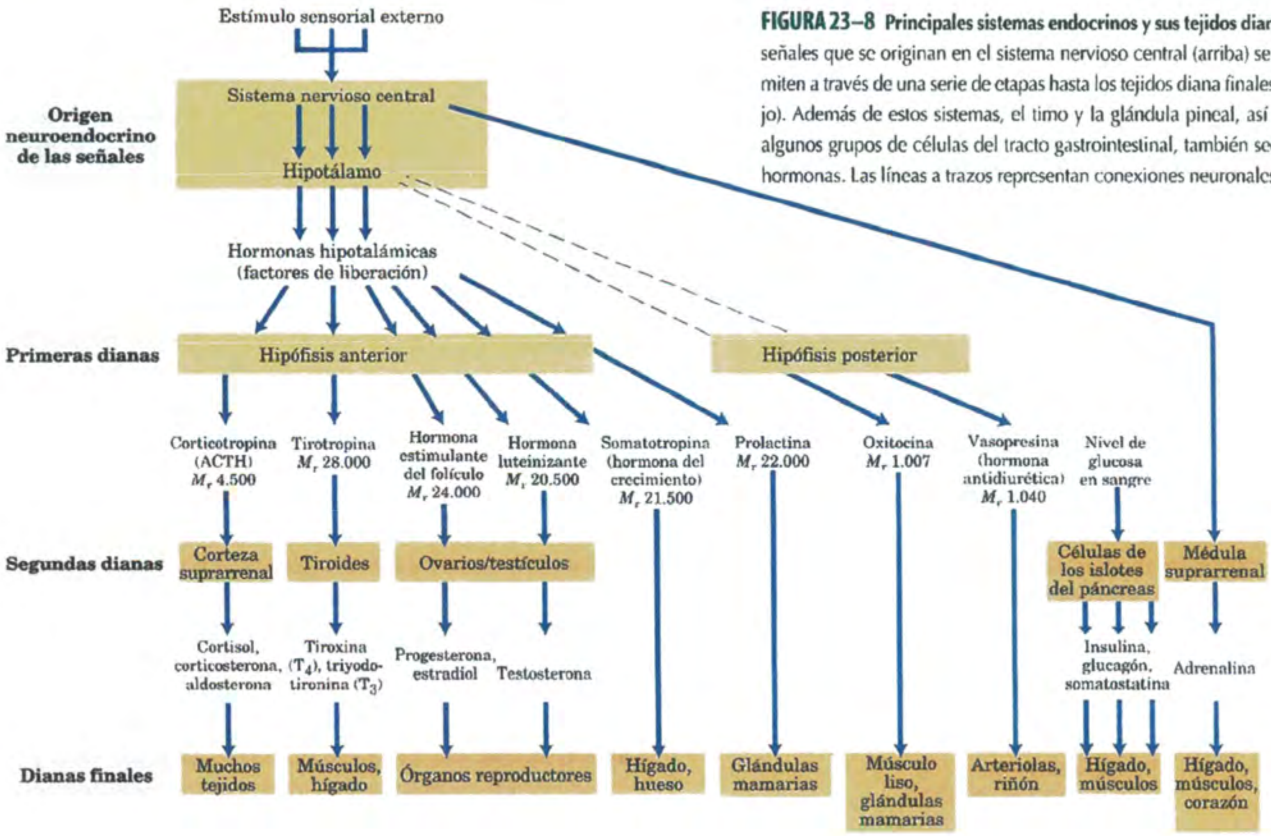
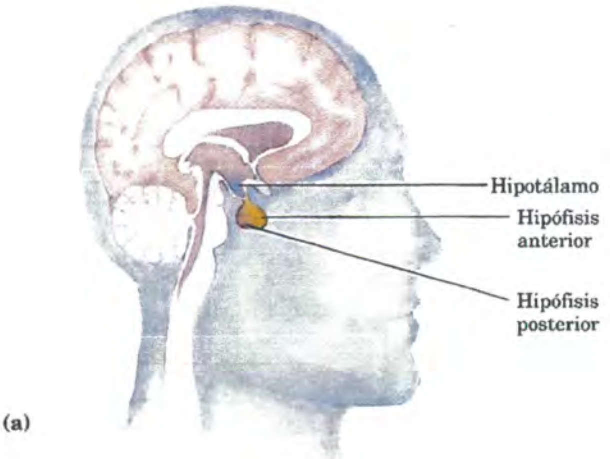


FIGURA 23–8 Principales sistemas endocrinos y sus tejidos diana. Las señales que se originan en el sistema nervioso central (arriba) se transmiten a través de una serie de etapas hasta los tejidos diana finales (abajo). Además de estos sistemas, el timo y la glándula pineal, así como algunos grupos de células del tracto gastrointestinal, también secretan hormonas. Las líneas a trazos representan conexiones neuronales.

cotropina del hipotálamo estimula la liberación de ACTH por la hipófisis anterior, que llega hasta la zona fasciculada de la corteza suprarrenal donde provoca la liberación de cortisol. El cortisol, la última hormona de esta cascada, actúa a través de sus receptores en muchos tipos de células diana para alterar su metabolismo. En los hepatocitos, una de las acciones del cortisol es aumentar la tasa de gluconeogénesis.

Las cascadas hormonales, tales como las responsables de la liberación del cortisol y de la adrenalina, tienen como resultado una gran amplificación de la señal inicial, y permiten la



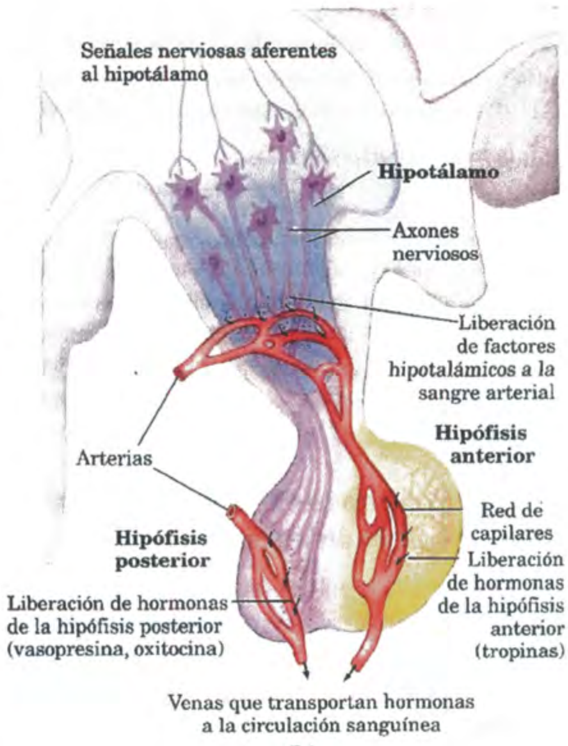
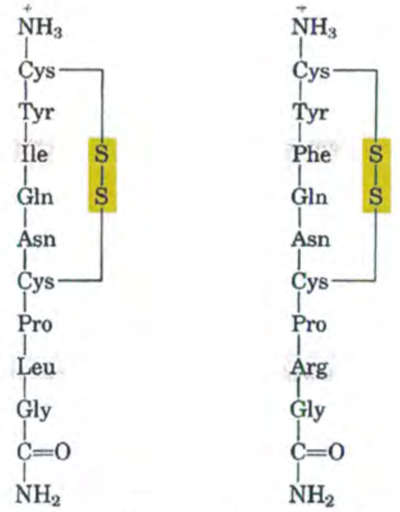


FIGURA 23–9 Orígenes neuroendocrinos de las señales hormonales. (a) Localización del hipotálamo y la hipófisis. **(b)** Detalles del sistema hipotálamo-hipófisis. Señales de neuronas conectoras estimulan la secreción de factores de liberación por el hipotálamo en un vaso sanguíneo, que los transporta directamente a una red de capilares en la hipófisis anterior. Como respuesta a cada factor de liberación hipotalámico, la hipófisis anterior libera la hormona apropiada a la circulación sanguínea general. Las hormonas de la hipófisis posterior se sintetizan en neuronas que parten del hipotálamo y que son transportadas a través de axones hasta las terminaciones nerviosas situadas en la hipófisis posterior y allí se almacenan hasta su liberación a la sangre en respuesta a una señal neuronal.



Oxitocina humana

Vasopresina humana (hormona antidiurética)

FIGURA 23–10 Dos hormonas de la hipófisis posterior. Los residuos de los extremos carboxilo son glicinamida, $—NH—CH_2—CONH_2$ (tal como se observó en la Fig. 23–2, la amidación del extremo carboxilo es común en las hormonas peptídicas cortas). Estas dos hormonas, idénticas en todos los residuos excepto dos (sombreados), tienen efectos fisiológicos muy distintos. La oxitocina actúa sobre los músculos lisos del útero y de la glándula mamaria, provocando contracciones uterinas durante el parto y promoviendo la secreción láctea durante la lactación. La vasopresina (también denominada hormona antidiurética) aumenta la reabsorción del agua en el riñón y provoca la contracción de los vasos sanguíneos, aumentando así la presión sanguínea.

modulación precisa de la producción de la hormona final **(Fig. 23–11)**. A cada nivel de la cascada, una pequeña señal provoca una respuesta mayor. Por ejemplo, la señal eléctrica inicial sobre el hipotálamo provoca la liberación de unos pocos *nanogramos* de hormona liberadora de la corticotropina, que estimula la liberación de unos pocos *microgramos* de corticotropina. La corticotropina actúa sobre la corteza suprarrenal dando lugar a la liberación de *miligramos* de cortisol, con una amplificación global de al menos un millón de veces.

A cada nivel de la cascada hormonal cabe la posibilidad de retroinhibición sobre etapas anteriores de la cascada; un nivel innecesariamente elevado de la hormona final o de una de las hormonas intermedias inhibe la liberación de las hormonas anteriores de la cascada. Estos mecanismos de retroalimentación cumplen la misma finalidad que los que limitan la producción de una vía biosintética: (compare la Fig. 23–11 con la Fig. 6–33): un producto se sintetiza (o libera) sólo hasta haber alcanzado la concentración necesaria.

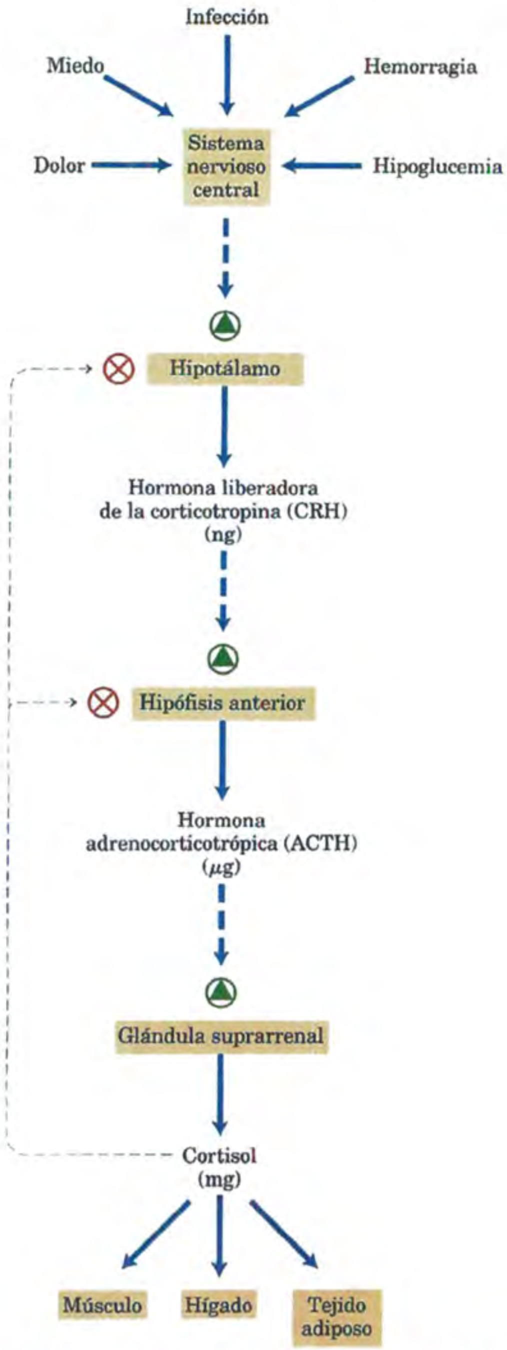


FIGURA 23–11 Cascada de liberación de hormonas inducida por la estimulación del hipotálamo por el sistema nervioso central. En cada tejido endocrino de la ruta, los estímulos procedentes de un nivel superior, una vez recibidos amplificados y transducidos en la liberación de la siguiente hormona de la cascada. La cascada puede ser regulada a diferentes niveles por retroinhibición por la última hormona (en este caso, cortisol). El producto, por tanto, controla su propia producción, como en las vías biosintéticas de las células individuales.

RESUMEN 23.1 Hormonas: estructuras diversas para funciones diversas

- Las hormonas son mensajeros químicos segregados en la sangre o en el fluido intersticial por determinados tejidos para regular la actividad de otras células o tejidos.
- El radioinmunoensayo y el ELISA son dos técnicas de gran sensibilidad para detectar y cuantificar hormonas.
- Las hormonas peptídicas, aminadas e icosanoides actúan desde el exterior de la célula diana a través de receptores específicos de la membrana plasmática que alteran el nivel de un segundo mensajero intracelular.

- Las hormonas esteroideas, la vitamina D, los retinoides y las hormonas tiroideas penetran en el interior de las células diana y alteran la expresión génica al interaccionar con receptores nucleares específicos.
- Las cascadas hormonales, en las que unos catalizadores activan otros catalizadores, amplifican el estímulo inicial varios órdenes de magnitud, a menudo en muy poco tiempo (segundos).
- Impulsos nerviosos estimulan el hipotálamo para enviar hormonas específicas a la hipófisis, que estimulan (o inhiben) así la liberación de hormonas trópicas. Las hormonas de la hipófisis anterior estimulan a su vez la secreción de hormonas características por otras glándulas endocrinas (tiroides, suprarrenales, páncreas), que a su vez estimulan tejidos diana específicos.

23.2 Metabolismo específico de los tejidos: división del trabajo

Cada tejido del cuerpo humano tiene una función especializada, que se manifiesta en su anatomía y en su actividad metabólica **(Fig. 23–12)**. El músculo esquelético permite el movimiento dirigido; el tejido adiposo almacena y libera energía en forma de grasas, que se utilizan como combustible en todo el organismo; el cerebro bombea iones a través de las membranas plasmáticas para producir señales eléctricas. El hígado tiene un papel central en la transformación y distribución en el metabolismo y proporciona a todos los demás órganos y tejidos una mezcla adecuada de nutrientes a través del torrente circulatorio. La centralidad funcional del hígado se pone de relieve en el hecho que todos los otros órganos y tejidos se designen comúnmente como "extrahepáticos" o "periféricos". Empezaremos pues nuestra discusión sobre la división del trabajo metabólico estudiando la transformación de los glúcidos, los aminoácidos y las grasas en el hígado de los mamíferos. A continuación describiremos brevemente las principales funciones metabólicas del tejido adiposo, el músculo, el cerebro y el medio que interconecta todos los demás: la sangre.

El hígado transforma y distribuye los nutrientes

Durante la digestión en los mamíferos, los tres principales tipos de nutrientes (glúcidos, proteínas y lípidos) experimentan hidrólisis enzimática hasta convertirse en sus constituyentes sencillos. Esta degradación es necesaria, puesto que las células epiteliales que revisten la luz intestinal sólo son capaces de ab-

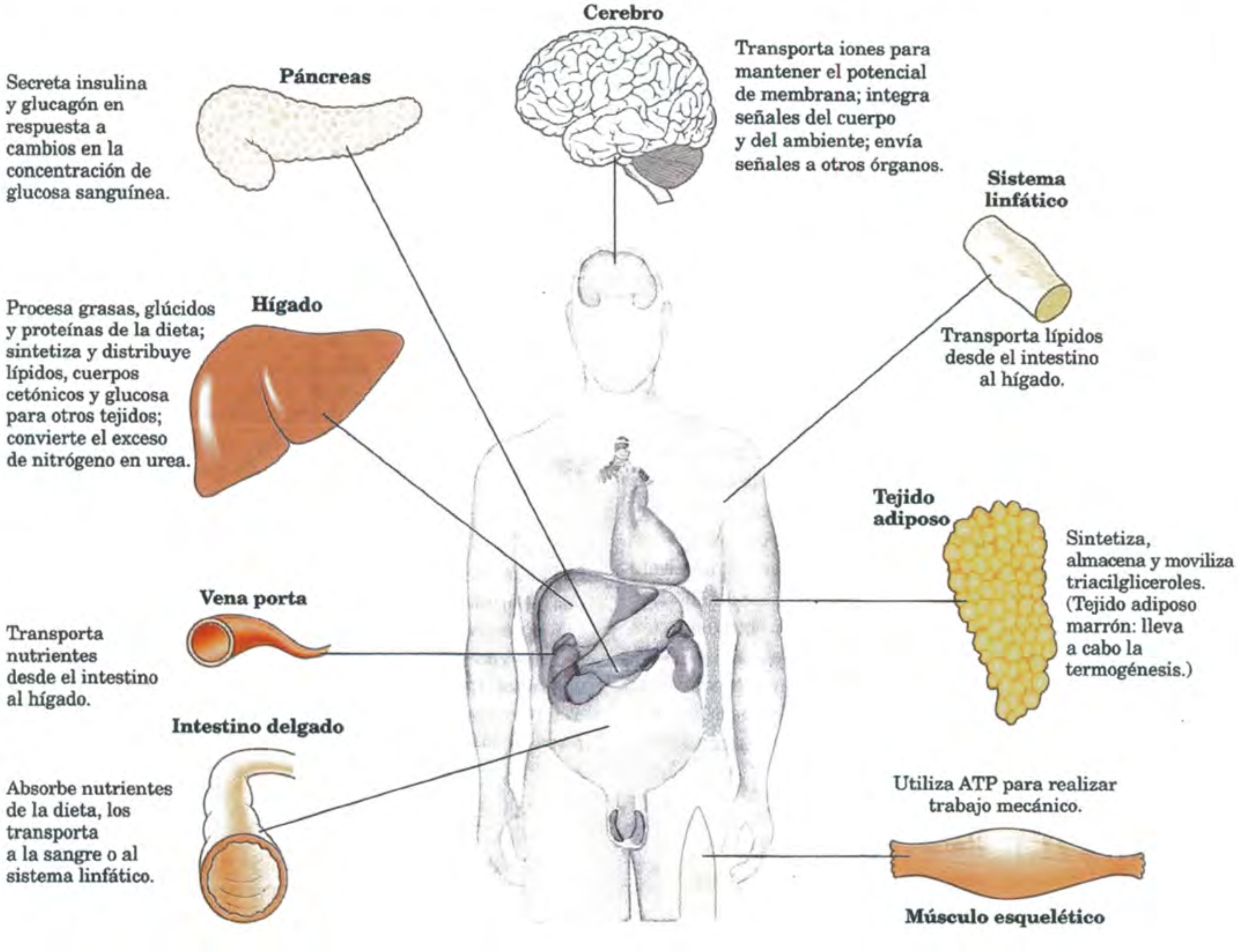


FIGURA 23–12 Funciones metabólicas especializadas de los tejidos de los mamíferos.

sorber moléculas relativamente pequeñas. Muchos de los ácidos grasos y monoacilgliceroles liberados en el intestino tras la digestión se convierten de nuevo en triacilgliceroles (TAG) en el interior de estas células epiteliales.

Después de ser absorbidos, la mayor parte de los azúcares y aminoácidos y algunos TAG reconstituidos pasan a los capilares de la sangre desde las células epiteliales del intestino y viajan hasta el hígado; el resto de TAG entran en el tejido adiposo a través del sistema linfático. La vena porta es una ruta directa desde los órganos digestivos al hígado, por lo que el hígado es el primero en tener acceso a los nutrientes ingeridos. El hígado tiene dos tipos principales de células. Las células de Kupffer son fagocitos, importantes en la función inmunitaria. Los **hepatocitos,** de interés primordial aquí, transforman los nutrientes obtenidos de la dieta en los combustibles y precursores necesarios para cada tejido y los exportan a través de la sangre. Los tipos y las cantidades de nutrientes suministrados por el hígado varían en función de diversos factores tales como el tipo de dieta y el intervalo de tiempo entre comidas. La demanda de combustibles y precursores de los tejidos extrahepáticos varía según el órgano, el nivel de actividad y el estado nutricional global del individuo.

El hígado tiene una notable flexibilidad metabólica para responder a estas circunstancias cambiantes. Por ejemplo, cuando la dieta es rica en proteínas, los hepatocitos contienen niveles elevados de enzimas para el catabolismo de los aminoácidos y la gluconeogénesis. Al cambiar a una dieta rica en glúcidos, los niveles de estos enzimas caen en pocas horas y empiezan a sintetizarse los enzimas necesarios para el metabolismo de los glúcidos y la síntesis de grasas. Los enzimas hepáticos se recambian (se sintetizan y degradan) a una velocidad cinco a diez veces superior a la velocidad de recambio de los enzimas en otros tejidos tales como el músculo. Los tejidos extrahepáticos también pueden ajustar su metabolismo a las condiciones imperantes, pero ninguno resulta tan adaptable como el hígado, ni tiene un papel tan central en las actividades metabólicas generales del organismo. A continuación se examinan los posibles destinos de los azúcares, aminoácidos y lípidos que entran en el

TABLA 23–2 Rutas metabólicas de los glúcidos, aminoácidos y grasas mostradas en capítulos anteriores

Vía	Referencia a la figura
Ciclo del ácido cítrico: acetil-CoA ⟶ $2CO_2$	16–7
Fosforilación oxidativa: síntesis de ATP	19–20
Catabolismo de los glúcidos	
Glucogenólisis: glucógeno ⟶ glucosa 1-fosfato ⟶ glucosa sanguínea	15–25; 15–26
Incorporación de hexosas a la glucólisis: fructosa, manosa, galactosa ⟶ glucosa 6-fosfato	14–10
Glucólisis: glucosa ⟶ piruvato	14–2
Reacción de la piruvato deshidrogenasa: piruvato ⟶ acetil-CoA	16–2
Fermentación del ácido láctico: glucosa ⟶ lactato + 2ATP	14–3
Ruta de las pentosas fosfato: glucosa 6-fosfato ⟶ pentosas fosfato + NADPH	14–21
Anabolismo de los glúcidos	
Gluconeogénesis: intermediarios del ciclo del ácido cítrico ⟶ glucosa	14–16
Ciclo glucosa-alanina: glucosa ⟶ piruvato ⟶ alanina ⟶ glucosa	18–9
Síntesis de glucógeno: glucosa 6-fosfato ⟶ glucosa 1-fosfato ⟶ glucógeno	15–30
Metabolismo de aminoácidos y nucleótidos	
Degradación de aminoácidos: aminoácidos ⟶ acetil-CoA, intermediarios del ciclo del ácido cítrico	18–15
Síntesis de aminoácidos	22–9
Ciclo de la urea: NH_3 ⟶ urea	18–10
Ciclo de la glucosa-alanina: alanina ⟶ glucosa	18–9
Síntesis de nucleótidos: aminoácidos ⟶ purinas, pirimidinas	22–33; 22–36
Síntesis de hormonas y neurotransmisores	22–29
Catabolismo de grasas	
β-Oxidación de los ácidos grasos: ácido graso ⟶ acetil-CoA	17–8
Oxidación de cuerpos cetónicos: β-hidroxibutirato ⟶ acetil-CoA ⟶ CO_2 del ciclo del ácido cítrico	17–19
Anabolismo de las grasas	
Síntesis de ácidos grasos: acetil-CoA ⟶ ácidos grasos	21–6
Síntesis de triacilgliceroles: acetil-CoA ⟶ ácidos grasos ⟶ triacilglicerol	21–18; 21–19
Formación de cuerpos cetónicos: acetil-CoA ⟶ acetoacetato, β-hidroxibutirato	17–18
Síntesis de colesterol y de sus ésteres: acetil-CoA ⟶ colesterol ⟶ ésteres de colesterol	21–33 a 21–37
Síntesis de fosfolípidos: ácidos grasos ⟶ fosfolípidos	21–17; 21–23 a 21–28

hígado desde el torrente circulatorio. Para ayudar a recordar las transformaciones metabólicas implicadas, la Tabla 23–2 muestra las principales rutas y procesos que examinaremos, con mención de la figura en la que se muestra el detalle de cada ruta. En las Figuras 23–13 a 23–15 mostramos resúmenes de las rutas con las reacciones destacadas en el texto numeradas.

Azúcares El transportador de glucosa de los hepatocitos (GLUT2) es tan efectivo que la concentración de glucosa en el interior de un hepatocito es esencialmente igual a la de la sangre. La glucosa que entra en los hepatocitos es fosforilada por la hexoquinasa IV (glucoquinasa) para dar glucosa 6-fosfato. La glucoquinasa tiene una K_m para la glucosa (10 mM) mucho más alta que los isozimas de la hexoquinasa en otras células (p. 584); a diferencia de estos otros isozimas, no es inhibida por su producto, la glucosa 6-fosfato. La presencia de glucoquinasa permite que los hepatocitos continúen fosforilando glucosa cuando su concentración alcanza niveles muy por encima de aquellos que resultarían saturantes para las demás hexoquinasas. La elevada K_m de la glucoquinasa también asegura que la fosforilación de la glucosa en los hepatocitos sea mínima cuando la concentración de glucosa es baja, impidiendo así que el hígado consuma glucosa como combustible a través de la glucólisis. Ello contribuye al ahorro de glucosa, que puede destinarse a otros tejidos. La fructosa, la galactosa y la manosa absorbidas en el intestino delgado también se convierten en glucosa 6-fosfato a través de las rutas enzimáticas examinadas en el Capítulo 14. La glucosa 6-fosfato se encuentra en la encrucijada del metabolismo de los glúcidos en el hígado. Puede optar entre varias rutas metabólicas principales **(Fig. 23–13)**, según las necesidades metabólicas del organismo. El flujo de glucosa es dirigido en el hígado hacia una o más de estas rutas por la actividad de varios enzimas regulados alostéricamente y por la regulación hormonal de la síntesis y actividad enzimáticas.

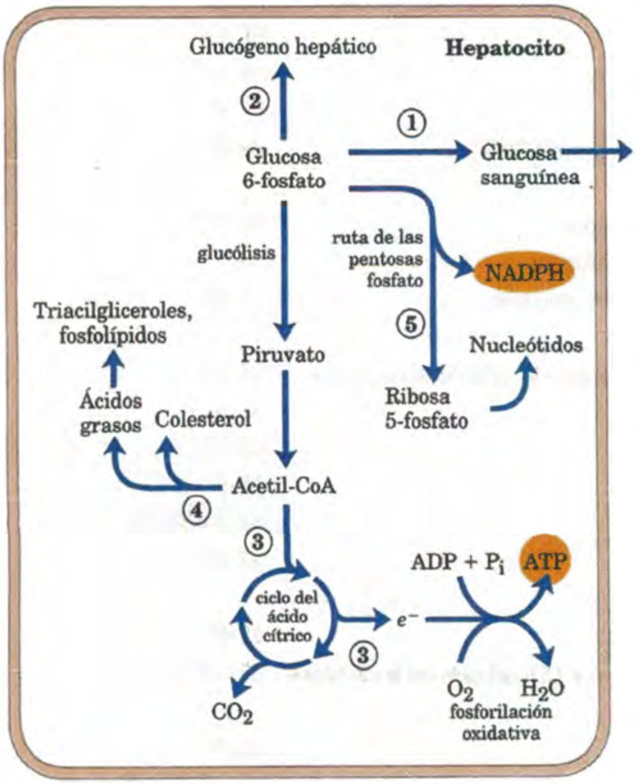


FIGURA 23–13 Rutas metabólicas de la glucosa 6-fosfato en el hígado. En ésta y en las figuras 23–14 y 23–15, las rutas anabólicas se indican dirigidas hacia arriba, las rutas catabólicas hacia abajo y la distribución hacia otros órganos horizontalmente. La numeración de los procesos en cada figura se describe en el texto.

① La glucosa 6-fosfato es desfosforilada por la glucosa 6-fosfatasa para dar glucosa libre (véase la Fig. 15–28), que se exporta para mantener los niveles de glucosa en sangre. La exportación es la vía predominante cuando la cantidad de glucosa 6-fosfato es limitada, puesto que la concentración de glucosa en sangre debe mantenerse suficientemente alta (4 mM) para proporcionar la energía adecuada al cerebro y demás tejidos. ② La glucosa 6-fosfato que no es necesaria de modo inmediato para formar glucosa sanguínea se transforma en glucógeno hepático o tiene algún otro destino. Después de la glucólisis y la reacción de la piruvato deshidrogenasa, ③ el acetil-CoA así formado puede oxidarse para la producción de energía en el ciclo del ácido cítrico; la transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa consiguientes proporcionan ATP. (Sin embargo, normalmente los ácidos grasos son el combustible preferido para la producción de energía en los hepatocitos.) ④ El acetil-CoA también puede servir de precursor para la síntesis de ácidos grasos, que son incorporados en los TAG, fosfolípidos y colesterol. Una buena parte de los lípidos que se sintetizan en el hígado se transportan a otros tejidos por lipoproteínas plasmáticas. ⑤ Como alternativa, la glucosa 6-fosfato puede entrar en la vía de las pentosas fosfato, que proporciona el poder reductor (NADPH) necesario para la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol, y D-ribosa 5-fosfato, un precursor en la biosíntesis de los nucleótidos. El NADPH es también un cofactor esencial en la destoxificación y eliminación de muchos medicamentos y otros xenobióticos metabolizados en el hígado.

Aminoácidos Los aminoácidos que entran en el hígado pueden tomar diferentes rutas metabólicas importantes **(Fig. 23–14)**. ① Actúan como precursores para la síntesis de proteínas, proceso contemplado en el Capítulo 27. El hígado renueva constantemente sus propias proteínas, que tienen una velocidad de recambio relativamente elevada (vida media de unas pocas horas a unos pocos días), y es el sitio de la biosíntesis de la mayor parte de las proteínas plasmáticas. ② Como alternativa, los aminoácidos pueden pasar a otros órganos a través de la sangre para ser utilizados como precursores en la síntesis de proteínas tisulares. ③ Otros aminoácidos se utilizan como precursores en la biosíntesis de nucleótidos, hormonas y otros compuestos nitrogenados en el hígado y otros tejidos.

④a Los aminoácidos no necesarios como precursores biosintéticos se transaminan o desaminan y son degradados para dar piruvato e intermedios del ciclo del ácido cítrico que siguen diversos destinos; ④b el amoníaco liberado se convierte en el producto de excreción urea. ⑤ El piruvato puede convertirse en glucosa y glucógeno a través de la gluconeogénesis o ⑥ convertirse en acetil-CoA, con varios destinos posibles: ⑦ puede ser oxidado en el ciclo del ácido cítrico y ⑧ la fosforilación oxidativa para producir ATP, o ⑨ convertirse en lípidos para su almacenamiento. ⑩ Los intermedios del ciclo del ácido cítrico pueden salir del mismo para la síntesis de glucosa por gluconeogénesis.

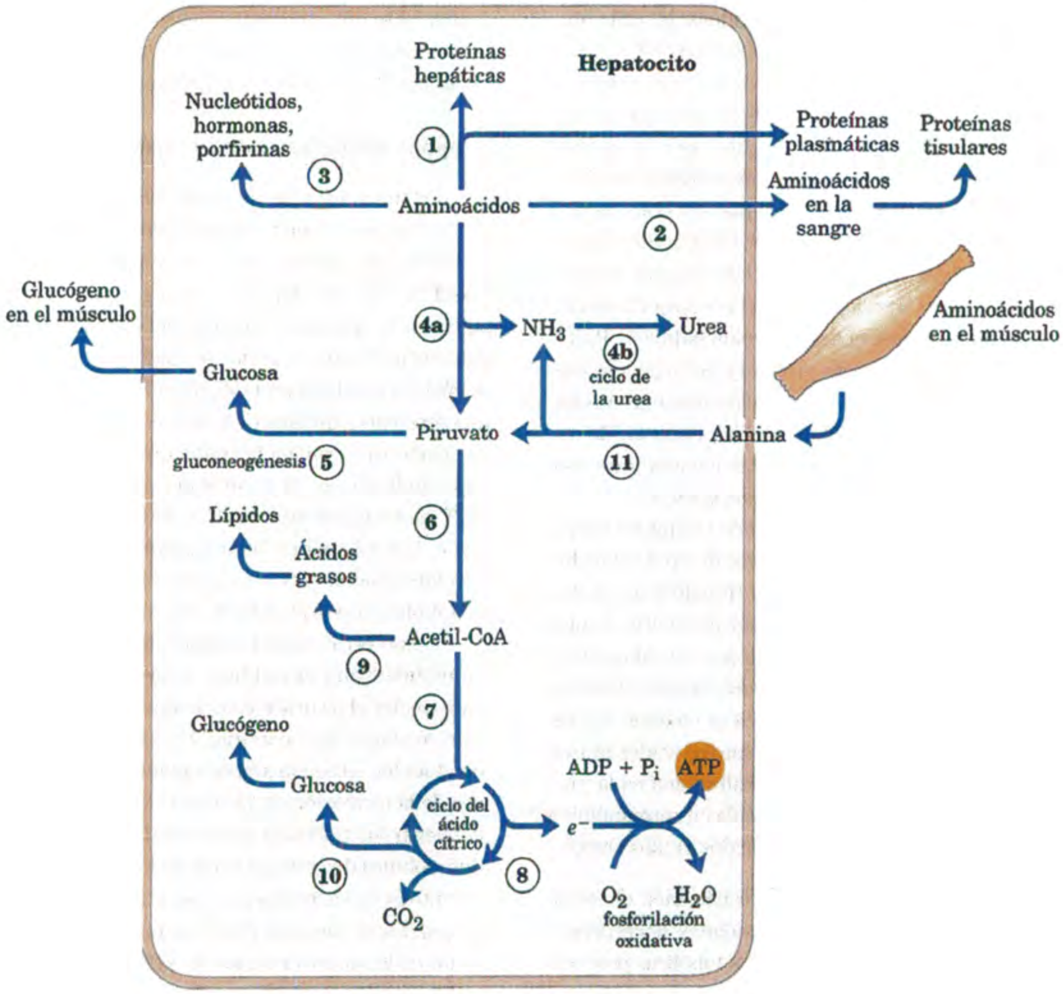


FIGURA 23–14 Metabolismo de los aminoácidos en el hígado.

El hígado también metaboliza los aminoácidos que llegan de forma intermitente desde otros tejidos. La sangre recibe un suministro adecuado de glucosa después de la digestión y absorción de los glúcidos de la dieta o bien, entre comidas, por la conversión del glucógeno hepático en glucosa sanguínea. En los intervalos entre comidas, especialmente si son prolongados, una parte de la proteína muscular se degrada a aminoácidos. Estos aminoácidos ceden sus grupos amino (por transaminación) al piruvato, el producto de la glucólisis, para dar alanina, que ⑪ es transportada hasta el hígado y desaminada. El piruvato resultante es convertido por los hepatocitos en glucosa sanguínea (por gluconeogénesis ⑤) y el amoníaco se transforma en urea para su excreción ④b. Una ventaja de este ciclo de la glucosa-alanina (véase la Fig. 18–9) consiste en suavizar las fluctuaciones de la glucosa sanguínea entre las comidas. El déficit de aminoácidos padecido por el músculo se compensa después de la comida siguiente con los aminoácidos de la dieta.

Lípidos Los ácidos grasos de los lípidos que entran en los hepatocitos también tienen distintos destinos metabólicos **(Fig. 23–15)**. ① Algunos se convierten en lípidos del hígado. ② En la mayoría de las circunstancias, los ácidos grasos constituyen el principal combustible oxidado por el hígado. Los ácidos grasos libres pueden ser activados y oxidados para dar acetil-CoA y NADH. ③ El acetil-CoA es oxidado ulteriormente a tra-

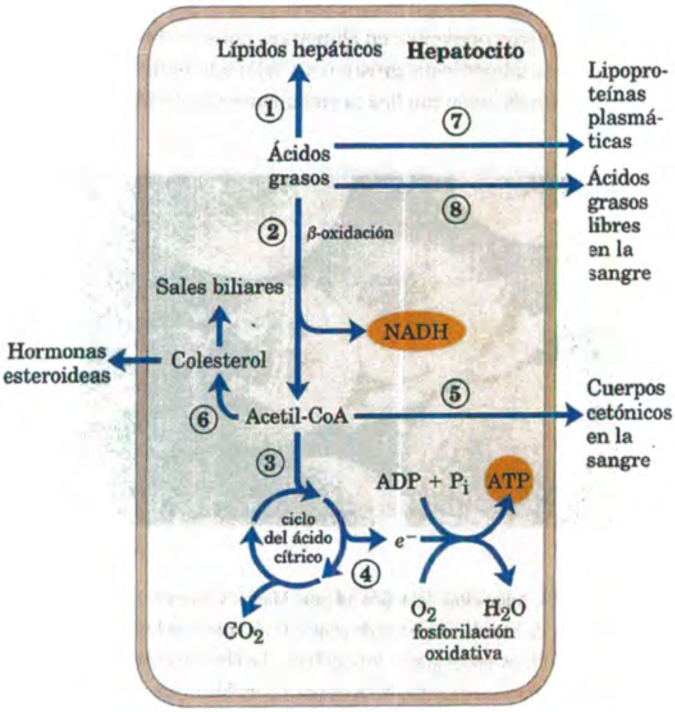


FIGURA 23–15 Metabolismo de los ácidos grasos en el hígado.

vés del ciclo del ácido cítrico y ④ las oxidaciones del ciclo impulsan la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. ⑤ El exceso de acetil-CoA liberado en la oxidación de los ácidos grasos y no utilizado por el hígado se convierte en cuerpos cetónicos, acetoacetato y β-hidroxibutirato, que circulan por la sangre hasta otros tejidos, que los utilizan como combustibles en el ciclo del ácido cítrico. Los cuerpos cetónicos pueden considerarse una forma de transporte de grupos acetilo. Pueden suministrar una parte significativa de la energía en algunos tejidos extrahepáticos, hasta una tercera parte en el corazón y hasta el 60 o 70% en el cerebro durante el ayuno prolongado. ⑥ Parte del acetil-CoA derivado de los ácidos grasos (y de la glucosa) se utiliza en la biosíntesis del colesterol, necesario para la síntesis de las membranas. El colesterol es también el precursor de todas las hormonas esteroideas y de las sales biliares, que son esenciales para la digestión y absorción de los lípidos.

Los dos destinos metabólicos restantes de los lípidos precisan mecanismos especiales para el transporte de lípidos insolubles en la sangre. ⑦ Los ácidos grasos se transforman en los fosfolípidos y los TAG de las lipoproteínas plasmáticas, que transportan lípidos hasta el tejido adiposo para su almacenamiento en forma de TAG.⑧ Algunos ácidos grasos libres se unen a la seroalbúmina y son transportados al corazón y a los músculos esqueléticos, que absorben y oxidan los ácidos grasos libres como combustible principal. La seroalbúmina es la proteína plasmática más abundante; una molécula de seroalbúmina puede transportar hasta 10 moléculas de ácidos grasos libres.

Así pues, el hígado actúa como centro de distribución del organismo, que exporta nutrientes en las cantidades necesarias a otros órganos, amortigua las fluctuaciones metabólicas provocadas por la ingestión intermitente de comida y transforma el exceso de grupos amino en urea y otros productos que serán eliminados por los riñones. Ciertos nutrientes, entre ellos los iones Fe y la vitamina A, se almacenan en el hígado. El hígado también destoxifica compuestos orgánicos foráneos, tales como fármacos, aditivos presentes en alimentos, conservantes y otros agentes potencialmente peligrosos o sin valor alimenticio. El proceso de destoxificación implica normalmente una hidroxilación, dependiente del citocromo P-450, de compuestos orgánicos, relativamente insolubles, para aumentar su solubilidad y facilitar así su ulterior degradación y excreción (véase el Recuadro 21–1).

El tejido adiposo almacena y suministra ácidos grasos

Hay dos tipos distintos de tejido adiposo, el blanco y el marrón, con funciones completamente diferentes. Describiremos primero el más abundante de los dos. El **tejido adiposo blanco (WAT) (Fig. 23–16a)** es amorfo y se halla ampliamente distribuido en el organismo: bajo la piel, alrededor de los vasos sanguíneos profundos y en la cavidad abdominal. Los **adipocitos** del WAT son células grandes (30 a 70 μm), esféricas y contienen una única gota lipídica (TAG) que constituye un 65% de la masa celular que confina las mitocondrias y el núcleo en una fina capa limitada por la membrana plasmática (Fig. 23–16b). El WAT suele representar un 15% de la masa de un hombre adulto joven. Los adipocitos son metabólicamente muy activos y responden rápidamente a estímulos hormonales en coordinación metabólica con el hígado, el músculo esquelético y el corazón.

Como otros tipos celulares, los adipocitos tienen un activo metabolismo glucolítico, utilizan el ciclo del ácido cítrico para oxidar el piruvato y los ácidos grasos y realizan la fosforilación oxidativa mitocondrial. En períodos de elevada ingestión de glúcidos, el tejido adiposo puede convertir la glucosa (a través de la formación de piruvato y acetil-CoA) en ácidos grasos, convertir los ácidos grasos en TAG y almacenarlos como grandes glóbulos de grasa, aunque en los humanos la mayor parte de la síntesis de ácidos grasos tiene lugar en los hepatocitos. Los adipocitos almacenan TAG, que proceden del hígado (transportados en la sangre en forma de VLDL; véase la Fig. 21–40a) y del tracto intestinal (transportados en los quilomicrones), especialmente después de comidas ricas en grasas.

Cuando aumenta la demanda de combustible, los TAG almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados por lipasas en el interior de los adipocitos para liberar los ácidos grasos, que pueden ser entonces transferidos, a través del torrente circulatorio, al músculo esquelético y al corazón. La liberación de ácidos grasos por los adipocitos se acelera en gran medida por

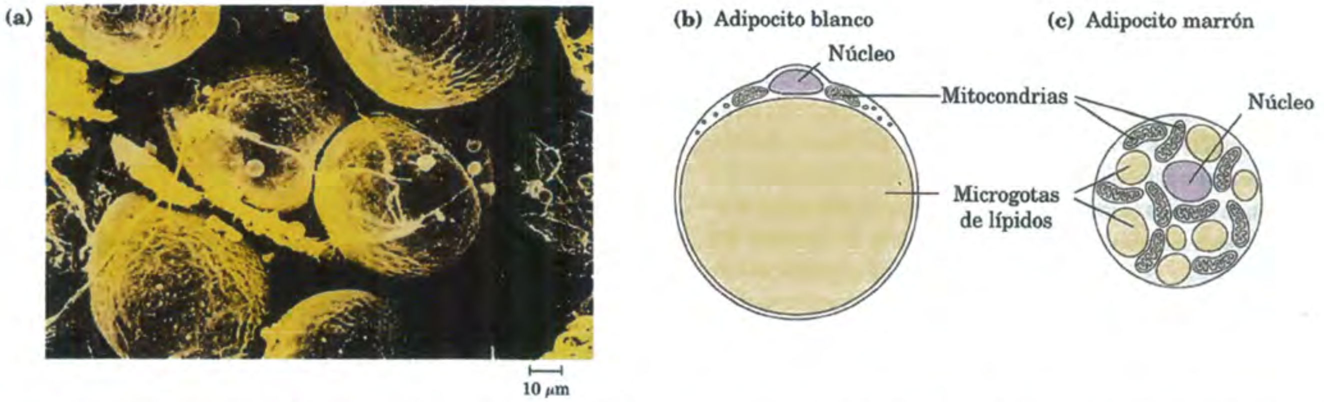


FIGURA 23–16 Adipocitos del tejido adiposo blanco y marrón. **(a)** Micrografía electrónica de barrido coloreada de adipocitos humanos del tejido adiposo blanco (WAT). En los tejidos grasos, los capilares y las fibras de colágeno forman un retículo de soporte alrededor de los adipocitos esféricos. Casi todo el volumen de estas células metabólicamente activas está ocupado por una microgota de grasa. **(b)** Un adipocito típico del WAT y **(c)** un adipocito del tejido adiposo marrón (BAT). En las células del BAT, las mitocondrias son mucho más abundantes, el núcleo se encuentra cerca del centro de la célula y se observan múltiples microgotas de grasa. Los adipositos blancos son mayores y contienen una única microgota de gran tamaño, que comprime las mitocondrias y el núcleo contra la membrana plasmática.

acción de la adrenalina, que estimula la fosforilación dependiente de cAMP de la perilipina; lo cual permite el acceso de la lipasa sensible a hormonas a los TAG de la gotícula de lípido (véase la Fig. 17–3). La lipasa sensible a hormonas también se estimula por fosforilación, pero no es ésta la causa principal del aumento de la lipólisis. La insulina contrarresta este efecto de la adrenalina disminuyendo la actividad de la lipasa.

La degradación y síntesis de TAG en el tejido adiposo constituye un ciclo de sustrato; hasta el 70% de los ácidos grasos liberados por la lipasa sensible a hormonas son reesterificados en los adipositos, volviendo a formar TAG. Recuérdese del Capítulo 15 que estos ciclos de sustrato permiten una regulación fina de la velocidad y dirección del flujo de intermedios a través de una ruta bidireccional. En el tejido adiposo, el glicerol liberado por la lipasa sensible a hormonas no se puede reutilizar en la síntesis de TAG, porque los adipocitos no poseen el enzima glicerol quinasa. En cambio, el glicerol fosfato que se necesita para la síntesis de TAG se forma a partir del piruvato por gliceroneogénesis, en la que interviene el enzima citosólico PEP carboxiquinasa (véase la Fig. 21–22).

Además de su principal función como depósito energético, el tejido adiposo juega un papel importante como órgano endocrino, produciendo y liberando hormonas que coordinan el metabolismo de las grasas y de los azúcares en todo el organismo en función del estado de las reservas energéticas. Volveremos a esta función más adelante en este capítulo cuando discutamos la regulación hormonal de la masa corporal.

El tejido adiposo marrón es termogénico

En los vertebrados de pequeño tamaño y en los animales que hibernan, una parte importante del tejido adiposo es **tejido adiposo marrón (BAT),** que se distingue del WAT por el menor tamaño (diámetro entre 20 y 40 μm) y la diferente forma (poligonal, no redonda) de los adipocitos (Fig. 23–16c). Al igual que los adipocitos blancos, los adipocitos marrones almacenan triacilgliceroles, pero en varias gotas lipídicas más pequeñas por célula, en lugar de en una sola gota central. Las células del BAT tienen más mitocondrias y una mayor vascularización que las células del WAT, y los citocromos de las mitocondrias y la hemoglobina de los capilares confieren al BAT su característico color marrón. Un rasgo único de los adipocitos marrones es la intensa expresión del gen *UNC1*, que codifica la **termogenina,** la proteína mitocondrial desacoplante (véase la Fig. 19–34). La actividad de la termogenina es responsable de la principal función del BAT: la **termogénesis.**

En los adipocitos marrones, los ácidos grasos almacenados en gotas de lípido se liberan, entran en las mitocondrias y se convierten por completo en CO_2 por la vía de la β-oxidación y el ciclo del ácido cítrico. El $FADH_2$ y el NADH reducidos obtenidos así transfieren sus electrones al oxígeno molecular a través de la cadena respiratoria. En el WAT, los protones bombeados fuera de la mitocondria durante la transferencia de electrones vuelven a entrar en la matriz a través de la ATP sintasa, y la energía de la transferencia de electrones se aprovecha para la síntesis de ATP. En el BAT, la termogenina suministra una vía alternativa para la reentrada de los protones en la matriz que evita a la ATP sintasa; la energía del gradiente de protones se disipa como calor, que mantiene al organismo (sobre todo el sistema nervioso y las vísceras) a temperatura óptima cuando la temperatura ambiente es más bien baja.

FIGURA 23–17 Distribución del tejido adiposo marrón en un recién nacido. Los recién nacidos tienen tejido adiposo marrón distribuido tal como se muestra para proteger los vasos sanguíneos principales y los órganos internos. El tejido adiposo marrón retrocede con el tiempo, hasta casi desaparecer en el adulto.

En el feto humano, la diferenciación de los fibroblastos "preadipocitos" en BAT empieza a la vigésima semana de gestación, y en el momento del nacimieno el BAT representa el 1% del peso corporal total. Los depósitos de grasa marrón están localizados allí donde el calor generado por termogénesis puede garantizar que los tejidos vitales (los vasos sanguíneos de la cabeza, los vasos abdominales principales y las vísceras, incluidos el páncreas, las glándulas suprarrenales y los riñones), no se enfríen en exceso cuando el recién nacido entra en un mundo con menor temperatura ambiente **(Fig. 23–17)**.

En el nacimiento empieza a desarrollarse el WAT mientras que el BAT empieza a desaparecer. En la edad adulta los humanos no tienen depósitos discretos de BAT, aunque algunos adipocitos marrones permanecen diseminados a través del WAT, constituyendo el del 1% de todos los adipocitos. Los adultos también tienen preadipocitos a los que se puede inducir la diferenciación en BAT durante la adaptación a la exposición crónica al frío. Las personas con feocromocitoma (tumores de la cápsula suprarrenal) producen adrenalina y noradrenalina en exceso, siendo uno de los efectos la diferenciación de preadipocitos en regiones discretas de BAT, localizados como en los recién nacidos. En la adaptación al frío crónico y en la diferenciación normal de WAT y BAT juega un papel central el factor de transcripción nuclear PPARγ (descrito más adelante).

Los músculos utilizan ATP para realizar trabajo mecánico

El metabolismo de las células del músculo esquelético, los **miocitos,** está especializado en generar ATP como fuente inmediata de energía para la contracción. Además, el músculo esquelético está adaptado para realizar trabajo mecánico de forma intermitente, según la demanda. A veces, el músculo esquelético debe trabajar a su máxima capacidad durante un tiempo corto, como en una carrera de 100 m; otras veces se requiere un esfuerzo prolongado, como en una carrera de maratón o durante un trabajo físico prolongado.

Existen dos clases generales de tejido muscular, que difieren en su función fisiológica y en la utilización de combustibles. El **músculo de contracción lenta,** o músculo rojo, proporciona una tensión relativamente baja pero es muy resistente a la fatiga. Produce ATP por el proceso relativamente lento, pero constante, de la fosforilación oxidativa. El músculo rojo es muy rico en mitocondrias y está irrigado por una red muy densa de vasos sanguíneos que aportan el oxígeno necesario para la producción de ATP. El **músculo de contracción rápida,** o músculo blanco, tiene menos mitocondrias que el músculo rojo y tiene un menor aporte de vasos sanguíneos, pero puede desarrollar una tensión mayor y más rápidamente. El músculo blanco se fatiga más pronto porque cuando es activo utiliza el ATP a un ritmo por encima de su capacidad de reemplazarlo. Existe un componente genético en la proporción de músculo rojo y músculo blanco en cada individuo; con el entrenamiento puede mejorarse la resistencia del músculo de contracción rápida.

Los músculos esqueléticos pueden utilizar ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos o glucosa como fuente de energía, según el grado de actividad muscular **(Fig. 23–18)**. En el músculo en reposo los combustibles principales son los ácidos grasos libres procedentes del tejido adiposo y los cuerpos cetónicos procedentes del hígado. Estos compuestos se oxidan y se degradan para dar acetil-CoA, que entra en el ciclo del ácido cítrico para ser oxidado hasta CO_2. La transferencia de electrones al O_2 proporciona energía para la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. Los músculos moderadamente activos utilizan glucosa sanguínea, además de ácidos grasos y cuerpos cetónicos. La glucosa es fosforilada y degradada en la glucólisis hasta piruvato, que se convierte en acetil-CoA y se oxida por la vía del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa.

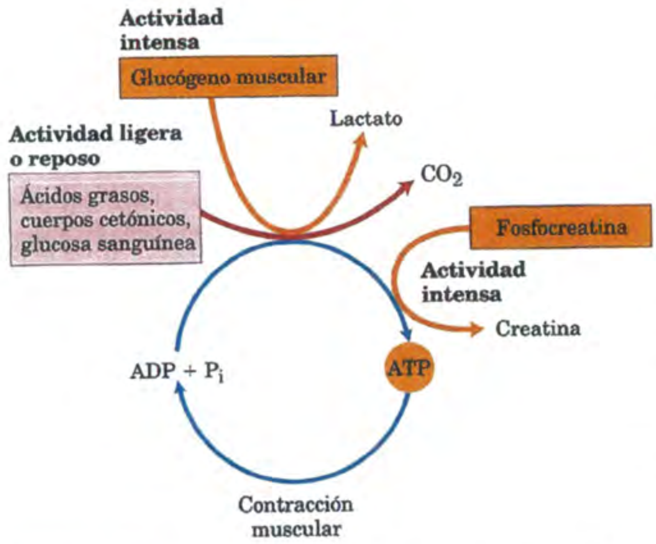


FIGURA 23–18 Fuentes de energía para la contracción muscular. Se utilizan diferentes combustibles para la síntesis de ATP durante la actividad intensa y durante la actividad ligera o el reposo. El ATP se puede obtener rápidamente a partir de la fosfocreatina.

En los músculos de contracción rápida con actividad máxima, la demanda de ATP es tan grande que el flujo sanguíneo no puede suministrar O_2 y combustibles a suficiente velocidad para cubrir las necesidades de ATP solamente a través de la respiración aeróbica. En estas circunstancias, el glucógeno almacenado en el músculo se degrada hasta lactato por fermentación (p. 530). Cada unidad de glucosa degradada proporciona tres ATP, porque la fosforólisis del glucógeno produce glucosa 6-fosfato (vía glucosa 1-fosfato), y ahorra el ATP que es consumido normalmente en la reacción de la hexoquinasa. La fermentación a ácido láctico responde así más rápidamente que la fosforilación oxidativa a un aumento en las necesidades de ATP, suplementando la producción basal de ATP procedente de la oxidación aeróbica de otros combustibles por la vía del ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria. La utilización de la glucosa sanguínea y del glucógeno muscular como combustibles para la actividad muscular aumenta de forma importante con la secreción de adrenalina, que estimula tanto la liberación de glucosa a partir del glucógeno hepático como la degradación del glucógeno en el tejido muscular.

Las cantidades relativamente pequeñas de glucógeno (alrededor de un 1% del peso total del músculo esquelético) limitan la cantidad de energía que se puede obtener por la vía glucolítica durante el ejercicio intenso. Además, la acumulación de lactato y la consiguiente disminución de pH que tiene lugar en los músculos activos reducen su eficacia. El músculo esquelético contiene sin embargo otra fuente de ATP, en forma de fosfocreatina (10-30 mM), que puede regenerar rápidamente ATP a partir de ADP por la reacción de la creatina quinasa:

Durante períodos de contracción activa y glucólisis, esta reacción transcurre predominantemente en la dirección de síntesis de ATP; durante la recuperación del ejercicio físico excesivo el mismo enzima resintetiza fosfocreatina a partir de creatina y ATP. Dados los niveles relativamente elevados de ATP y de fosfocreatina en el músculo, estos componentes pueden detectarse en tiempo real por espectroscopia de RMN **(Fig. 23–19)**.

Tras una actividad muscular intensa, el individuo sigue respirando profundamente durante algún tiempo, utilizando gran parte del O_2 extra para la fosforilación oxidativa en el hígado. El ATP producido se emplea para la gluconeogénesis (en el hígado) a partir de lactato, que es transportado por la sangre desde los músculos. La glucosa así formada vuelve a los músculos

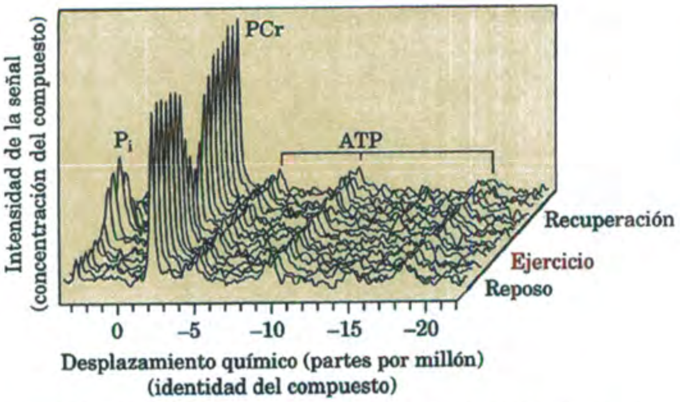


FIGURA 23–19 La fosfocreatina tampona la concentración de ATP durante el ejercicio. "Representación apilada" de espectros de resonancia magnética nuclear (de ^{31}P) que muestran el fosfato inorgánico (P_i), la fosfocreatina (PCr) y el ATP (cada uno de los tres fosfatos da una señal). Esta serie de gráficas representa el paso del tiempo entre un período de descanso a uno de ejercicio, seguido de recuperación. Observe que la señal del ATP apenas cambia durante el ejercicio, mantenida alta por la respiración contínua y por la reserva de fosfocreatina, que disminuye durante el ejercicio. Durante la recuperación, la producción de ATP por el catabolismo es mayor que el gasto de ATP por el (ahora en reposo) músculo, y la reserva de fosfocreatina se recupera.

para restablecer sus reservas de glucógeno, completando así el ciclo de Cori (**Fig. 23–20**; véase también el Recuadro 15–4).

Durante la contracción activa del músculo esquelético se genera calor a consecuencia del acoplamiento imperfecto de la energía química del ATP con el trabajo mecánico de la contracción. Esta producción de calor es aprovechada cuando la temperatura ambiente es baja: el músculo esquelético activa la **tiritera termógena,** contracciones musculares rápidas que producen calor pero poco movimiento y ayudan a mantener el cuerpo a su temperatura idónea de 37 °C.

El músculo cardíaco difiere del músculo esquelético por mantener una actividad continua, con un ritmo regular de contracción y relajación con un metabolismo completamente aeróbico en todo momento. Las mitocondrias son mucho más abundantes en el músculo cardíaco que en el músculo esquelético, llegando a representar casi la mitad del volumen de la célula (**Fig. 23–21**). El corazón utiliza como combustible principalmente ácidos grasos libres, pero también glucosa y cuerpos cetónicos, captados de la sangre; estos combustibles se oxidan a través del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa para generar ATP. Al igual que el músculo esquelético, el músculo cardíaco no almacena lípidos ni glucógeno en grandes cantidades. Tiene pequeñas cantidades de energía de reserva, suficientes para unos pocos segundos de contracción, en forma de fosfocreatina. Puesto que el corazón es normalmente aeróbico y obtiene su energía de la fosforilación oxidativa, la falta de O_2 en una parte del músculo cardíaco cuando los vasos san-

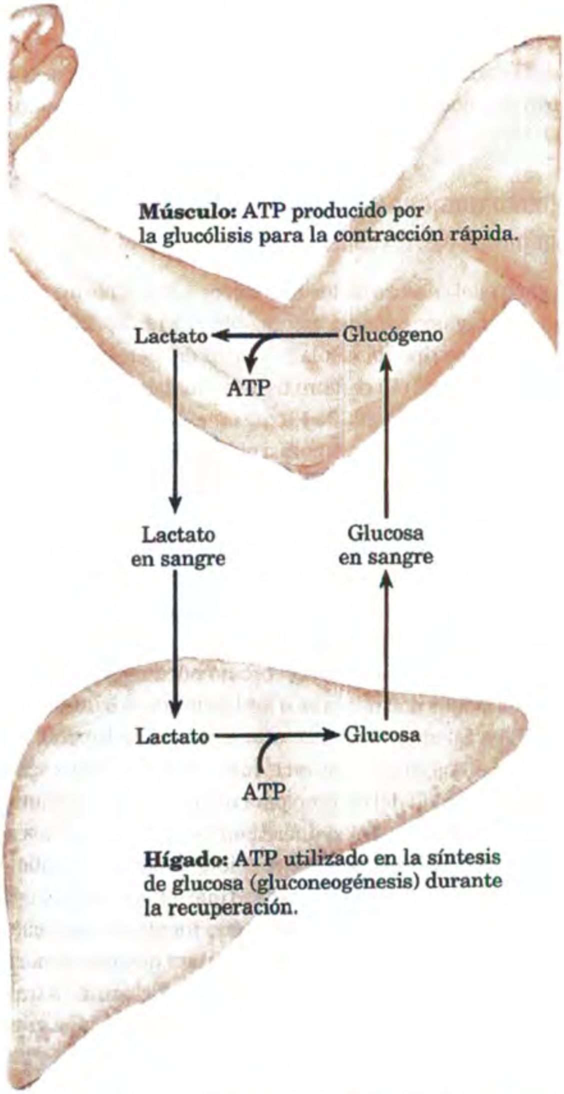


FIGURA 23–20 Cooperación metabólica entre el músculo esquelético y el hígado: el ciclo de Cori. Los músculos muy activos utilizan glucógeno como fuente de energía, produciendo lactato por la vía glucolítica. Durante la recuperación, parte de este lactato se transporta hasta el hígado y se convierte en glucosa por gluconeogénesis. Esta glucosa se vierte a la sangre y vuelve al músculo para restablecer las reservas de glucógeno. La ruta global (glucosa → lactato → glucosa) constituye el ciclo de Cori.

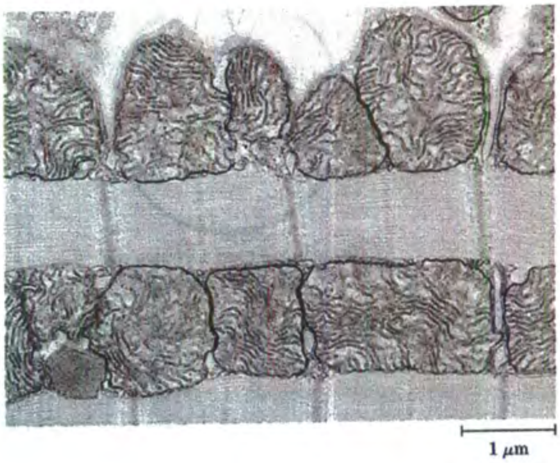


FIGURA 23–21 Micrografía electrónica del músculo cardíaco. El piruvato (procedente de la glucosa), los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos se oxidan en las abundantes mitocondrias del tejido cardíaco para impulsar la síntesis de ATP. Este metabolismo aeróbico constante permite al corazón humano bombear sangre a un ritmo de cerca de 6 litros por minuto, equivalente a unos 350 litros por hora, o 200 millones de litros en 70 años.

guíneos se bloquean por depósitos lipídicos (aterosclerosis) o por coágulos sanguíneos (trombosis coronaria) puede provocar la muerte de esta zona del músculo. Este proceso se conoce como infarto de miocardio o, más comúnmente, como ataque cardíaco. ■

El cerebro consume energía para la transmisión de los impulsos eléctricos

Las neuronas del cerebro de los mamíferos adultos normalmente sólo utilizan glucosa como combustible **(Fig. 23–22)**. (Los astrocitos, el otro tipo de célula principal del cerebro, pueden oxidar ácidos grasos.) El cerebro tiene un metabolismo respiratorio muy activo **(Fig. 23–23)**; consume O_2 a un ritmo bastante constante, que representa casi el 20% del total del O_2 consumido por el organismo en reposo. Dado que el cerebro contiene muy poco glucógeno, depende de forma permanente de la glucosa que llega por la sangre. Si la glucosa en sangre disminuye mucho por debajo de un nivel crítico, incluso durante un período de tiempo corto, pueden producirse graves alteraciones, a veces irreversibles, en la función cerebral.

Aunque las neuronas del cerebro no pueden utilizar directamente los ácidos grasos libres o los lípidos de la sangre como combustibles, pueden, si es necesario, utilizar β-hidroxibutirato (un cuerpo cetónico) formado en el hígado a partir de los ácidos grasos. La capacidad del cerebro para oxidar el β-hidroxibutirato por la vía del acetil-CoA adquiere importancia durante los períodos de ayuno prolongado o inanición, después de haberse agotado el glucógeno hepático, puesto que ello permite al cerebro utilizar la grasa del organismo como fuente de energía. Se preservan así las proteínas musculares hasta que se convierten en el último recurso del cerebro para obtener glucosa (a través de la gluconeogénesis en el hígado) durante la inanición grave.

Las neuronas oxidan la glucosa por la vía glucolítica y el ciclo del ácido cítrico. El flujo de electrones procedente de estas oxidaciones a través de la cadena respiratoria proporciona casi todo el ATP utilizado por estas células. Se necesita energía para crear y mantener un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de las neuronas. La membrana contiene un cotransportador electrogénico antiparalelo dependiente de ATP, la Na^+K^+ ATPasa, que bombea a la vez 2 iones K^+ hacia dentro y 3 iones Na^+ hacia fuera de la neurona (véase la Fig. 11–37). El potencial de transmembrana resultante cambia transitoriamente a medida que una señal eléctrica (potencial de acción) se transmite de un extremo a otro de la neurona (véase la Fig. 12–25). Los potenciales de acción son el principal mecanismo de transferencia de información en el sistema nervioso, de modo que la falta de ATP en las neuronas tiene efectos desastrosos sobre todas las actividades coordinadas por señalización neuronal.

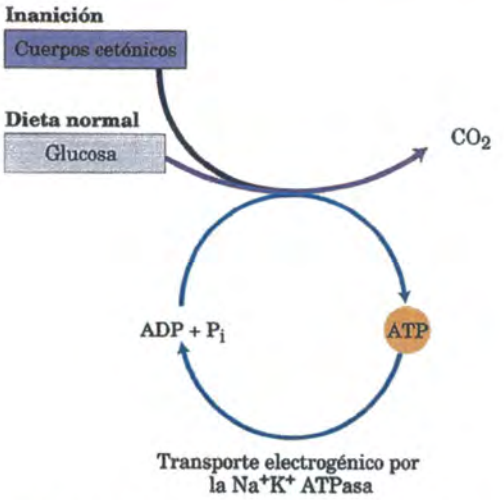


FIGURA 23–22 Los combustibles que suministran ATP al cerebro. Las fuentes de energía para el cerebro varían según el estado nutricional. El cuerpo cetónico utilizado por el cerebro durante la inanición es el β-hidroxibutirato. El transporte electrogénico por la Na^+K^+ATPasa mantiene el potencial de transmembrana, esencial para la transferencia de información entre las neuronas.

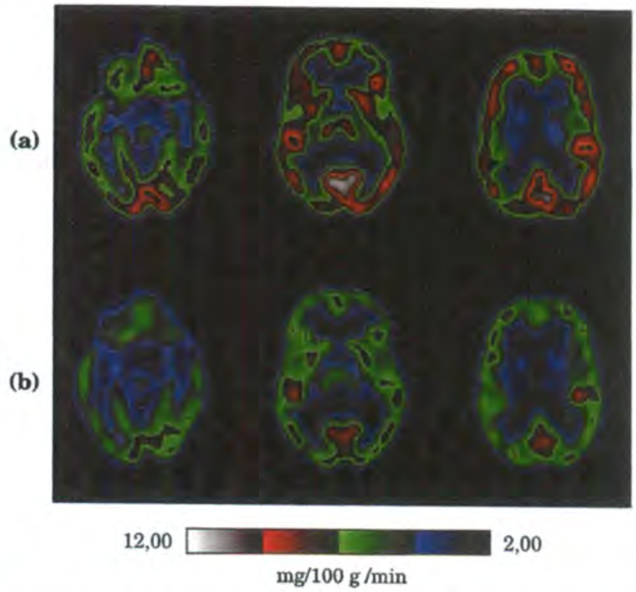


FIGURA 23–23 Metabolismo de la glucosa en el cerebro. La tomografía de emisión de positrones (PET) de barrido muestra la actividad metabólica en regiones específicas del cerebro. Los barridos de PET permiten visualizar la glucosa marcada isotópicamente en regiones del cerebro localizadas con precisión de una persona viva y en tiempo real. Se inyecta en el torrente sanguíneo un análogo de la glucosa que emite positrones (el 2-[^{18}F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa); unos segundos después, el PET muestra cuánta glucosa ha sido captada por cada región del cerebro, lo que constituye una medida de la actividad metabólica. En la figura se muestran imágenes de PET de secciones transversales antero-posteriores del cerebro a tres niveles desde la parte superior (izquierda) hasta la base (derecha). Las imágenes comparan el metabolismo de la glucosa cuando el sujeto se encuentra **(a)** en reposo y **(b)** privado de sueño durante 48 horas.

La sangre transporta oxígeno, metabolitos y hormonas

La sangre actúa de mediador de las interacciones metabólicas entre los tejidos. Transporta nutrientes desde el intestino delgado al hígado y desde el hígado y el tejido adiposo a otros órganos; también transporta productos de desecho desde los tejidos extrahepáticos al hígado para su transformación y hasta los riñones para su excreción. El oxígeno se desplaza en la sangre desde los pulmones a los tejidos, y el CO_2 generado por la respiración tisular vuelve por la sangre a los pulmones para su exhalación. La sangre también transporta señales hormonales de un tejido a otro. En su papel de transportador de señales, el sistema circulatorio se parece al sistema nervioso; ambos regulan e integran las actividades de diferentes órganos.

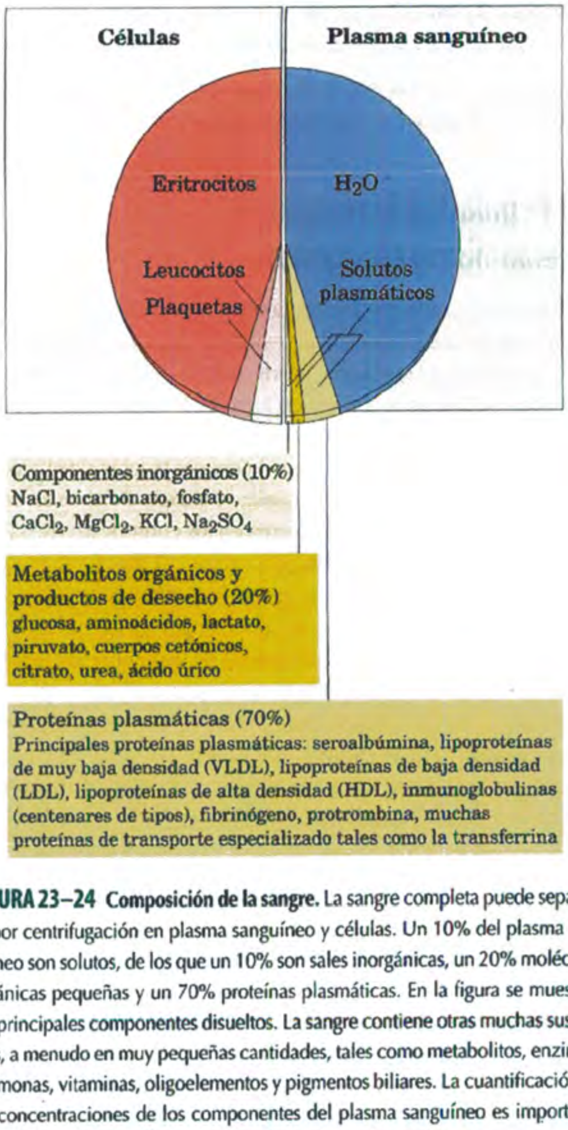


FIGURA 23–24 Composición de la sangre. La sangre completa puede separarse por centrifugación en plasma sanguíneo y células. Un 10% del plasma sanguíneo son solutos, de los que un 10% son sales inorgánicas, un 20% moléculas orgánicas pequeñas y un 70% proteínas plasmáticas. En la figura se muestran los principales componentes disueltos. La sangre contiene otras muchas sustancias, a menudo en muy pequeñas cantidades, tales como metabolitos, enzimas, hormonas, vitaminas, oligoelementos y pigmentos biliares. La cuantificación de las concentraciones de los componentes del plasma sanguíneo es importante para el diagnóstico y el tratamiento de muchas enfermedades.

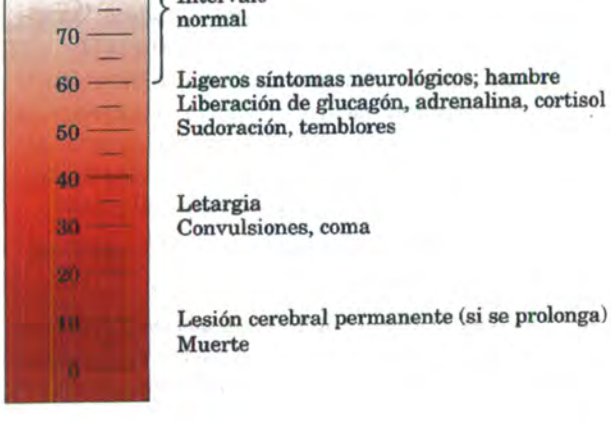
Un ser humano adulto medio tiene entre 5 y 6 L de sangre. Casi la mitad de este volumen está ocupado por tres tipos de células sanguíneas **(Fig. 23–24)**: **eritrocitos** (glóbulos rojos), cargados de hemoglobina y especializados en el transporte de O_2 y CO_2; una cantidad mucho menor de **leucocitos** (glóbulos blancos) de diferentes tipos (entre ellos los **linfocitos,** que también están en el tejido linfático), esenciales para el sistema inmunitario que defiende al organismo contra las infecciones; y **plaquetas,** que participan en la coagulación sanguínea. La parte líquida es el **plasma sanguíneo:** 90% de agua y 10% de solutos. Disueltos o en suspensión en el plasma hay una gran cantidad de proteínas, lipoproteínas, nutrientes, metabolitos, productos de desecho, iones inorgánicos y hormonas. Más del 70% de los sólidos del plasma son **proteínas plasmáticas,** sobre todo inmunoglobulinas (anticuerpos circulantes), seroalbúmina, apolipoproteínas implicadas en el transporte de lípidos, transferrina (para el transporte de hierro) y proteínas para la coagulación sanguínea tales como el fibrinógeno y la protrombina.

Los iones y los solutos de baja masa molecular en el plasma sanguíneo no son componentes permanentes, sino que se hallan en continuo intercambio entre la sangre y los diferentes tejidos. La incorporación de iones inorgánicos de la dieta, que son los electrolitos predominantes de la sangre y del citosol (Na^+, K^+ y Ca^{2+}), resulta generalmente compensada por su excreción en la orina. Muchos componentes de la sangre están cerca de un estado estacionario dinámico: la concentración del compuesto se modifica poco aunque haya un flujo continuo desde el aparato digestivo, a través de la sangre y hacia la orina. Los niveles plasmáticos de Na^+, K^+ y Ca^{2+} se mantienen alrededor de 140, 5 y 2,5 mM. Cualquier desviación importante de estos valores puede provocar una enfermedad grave o la muerte. Los riñones tienen un papel muy importante en el mantenimiento del equilibrio iónico, actuando como un filtro selectivo de los productos de desecho y del exceso de iones de la sangre, mientras que los nutrientes e iones esenciales son retenidos.

El eritrocito humano pierde su núcleo y las mitocondrias durante la diferenciación. Depende solamente de la glucólisis para su suministro de ATP. El lactato producido en la glucólisis vuelve al hígado, en donde se convierte en glucosa por la gluconeogénesis para ser almacenada en forma de glucógeno o para recircular hacia los tejidos periféricos. El eritrocito tiene un acceso constante a la glucosa de la sangre.

La concentración de glucosa en el plasma también está sujeta a una rígida regulación. Ya hemos mencionado la dependencia constante del cerebro respecto de la glucosa y el papel del hígado en el mantenimiento de la glucosa en sangre dentro de su intervalo normal entre 60 y 90 mg/100 mL en la sangre entera (~4,5 mM). (Puesto que los eritrocitos representan una fracción significativa del volumen sanguíneo, su eliminación por centrifugación permite obtener un sobrenadante fluido, el plasma, que contiene la "glucosa sanguínea" en un volumen más pequeño. Para convertir la glucosa en sangre en glucosa plasmática hay que multiplicar el nivel de glucosa en sangre por 1,14.) Cuando la glucosa en sangre cae hasta 40 mg/100 mL (estado hipoglucémico) **(Fig. 23–25)** se experimenta malestar y confusión mental; ulteriores disminuciones conducen al coma, convulsio-

FIGURA 23–25 Efectos fisiológicos de una baja concentración de glucosa sanguínea en humanos. Unos niveles de glucosa en sangre de 40 mg/100 mL o inferiores constituyen una hipoglucemia grave.



nes e incluso la muerte. El mantenimiento de la concentración normal de glucosa en la sangre es pues una alta prioridad para el organismo, por lo que diversos mecanismos han evolucionado con esta finalidad. Entre los reguladores más importantes de la glucosa en sangre se hallan las hormonas insulina, glucagón y adrenalina, que se examinan en la Sección 23.3. ■

RESUMEN 23.2 Metabolismo específico de los tejidos: división del trabajo

- En los mamíferos hay una división del trabajo metabólico entre tejidos y órganos especializados. El hígado es el órgano que centraliza la distribución y la transformación de los nutrientes. Los azúcares y aminoácidos producidos en la digestión atraviesan el epitelio intestinal y entran en la sangre, que los transporta hasta el hígado. Algunos triacilgliceroles procedentes de lípidos de la dieta también alcanzan el hígado, donde sus ácidos grasos constituyentes se utilizan en toda una serie de procesos.
- La glucosa 6-fosfato es el intermedio clave del metabolismo de los glúcidos. Puede polimerizar para dar glucógeno, puede ser desfosforilada a glucosa sanguínea o convertida en ácidos grasos a través del acetil-CoA. Puede ser oxidada por la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria para proporcionar ATP, o entrar en la vía de las pentosas fosfato para proporcionar pentosas y NADPH.
- Los aminoácidos se utilizan para sintetizar proteínas hepáticas y plasmáticas, o bien sus esqueletos carbonados pueden ser convertidos en glucosa y glucógeno a través de la gluconeogénesis; el amoníaco formado por desaminación se convierte en urea.
- El hígado convierte los ácidos grasos en triacilgliceroles, fosfolípidos o colesterol y sus ésteres para su transporte en forma de lipoproteínas plasmáticas hasta el tejido adiposo, donde se almacenan. Los ácidos grasos también pueden ser oxidados para dar ATP o para formar cuerpos cetónicos, que se enviarán a otros tejidos.
- El tejido adiposo blanco almacena grandes reservas de triacilgliceroles y los libera en la sangre como respuesta a la adrenalina y el glucagón. El tejido adiposo marrón está especializado en la termogénesis, que resulta de la oxidación de los ácidos grasos en mitocondrias desacopladas.
- El músculo esquelético está especializado en la producción y utilización de ATP para el trabajo mecánico. Durante un esfuerzo muscular vigoroso, el glucógeno es el combustible fundamental, proporcionando ATP por fermentación hasta ácido láctico. Durante la recuperación, el lactato se reconvierte (a través de la gluconeogénesis) en glucógeno y glucosa en el hígado. La fosfocreatina es una fuente inmediata de ATP durante la contracción activa.
- El músculo cardíaco obtiene casi todo su ATP a partir de la fosforilación oxidativa.
- Las neuronas del cerebro utilizan sólo glucosa y β-hidroxibutirato como fuentes de energía; el segundo es importante durante el ayuno. El cerebro utiliza la mayor parte de su ATP para el transporte de Na^+ y K^+ para mantener el potencial eléctrico a través de las membranas neuronales.
- La sangre transporta nutrientes, productos de desecho y señales hormonales entre los tejidos y órganos.

23.3 Regulación hormonal del metabolismo energético

Los ajustes constantes que mantienen los niveles de glucosa en sangre alrededor de 4,5 mM son el resultado de la acción combinada de la insulina, el glucagón, la adrenalina y el cortisol sobre los procesos metabólicos que tienen lugar en muchos tejidos pero especialmente en el hígado, el músculo y el tejido adiposo. La insulina indica a estos tejidos que la concentración de glucosa en sangre es superior a la necesaria; el exceso de glucosa es captado por las células y se transforma en los compuestos de almacenamiento, glucógeno y triacilgliceroles. El glucagón avisa de que los niveles de glucosa en sangre son demasiado bajos y los tejidos responden produciendo glucosa por medio de la degradación del glucógeno y (en el hígado) de la gluconeogénesis y oxidando las grasas para reducir el consumo de glucosa. La adrenalina se libera a la sangre para preparar los músculos, pulmones y corazón para un esfuerzo súbito e importante. El cortisol facilita la respuesta corporal al estrés de larga duración. Discutiremos estas regulaciones hormonales para tres estados metabólicos normales (bien alimentado, en ayuno e inanición) y examinaremos las consecuencias metabólicas de la diabetes mellitus, la cual es el resultado de trastornos en las rutas de señalización que controlan el metabolismo de la glucosa.

La insulina contrarresta la glucosa en sangre elevada

Actuando a través de receptores de la membrana plasmática (véanse las Figs. 12–15 y 12–16), la insulina estimula la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo (Tabla 23–3), donde se convierte en glucosa 6-fosfato. En el hígado, la insulina también activa la glucógeno sintasa e inactiva la glucógeno fosforilasa, de manera que buena parte de la glucosa 6-fosfato es canalizada hacia la síntesis de glucógeno.

La insulina estimula el almacenamiento del exceso de combustible en forma de grasa en el tejido adiposo **(Fig. 23–26)**. En el hígado, la insulina activa tanto la oxidación de la glucosa 6-fosfato a piruvato a través de la glucólisis como la oxidación del piruvato a acetil-CoA. De no sufrir ulterior oxidación para producir energía, este acetil-CoA se utiliza en la síntesis de ácidos grasos, que son exportados desde el hígado como TAG de las lipoproteínas plasmáticas (VLDL) al tejido adiposo. La insulina estimula la síntesis de TAG en los adipocitos a partir de los ácidos grasos liberados de los triacilgliceroles de las VLDL. Estos ácidos grasos proceden en última instancia del exceso de glucosa captada de la sangre por el hígado. En resumen, el efecto de la insulina consiste en favorecer el almacenamiento del exceso de glucosa sanguínea en forma de glucógeno (en el hígado y el músculo) y triacilgliceroles (en el tejido adiposo) (Tabla 23–3).

Además de actuar directamente sobre el músculo y el hígado para cambiar su metabolismo de los glúcidos y las grasas, la insulina puede actuar sobre estos tejidos indirectamente a través del cerebro, como se describirá más adelante.

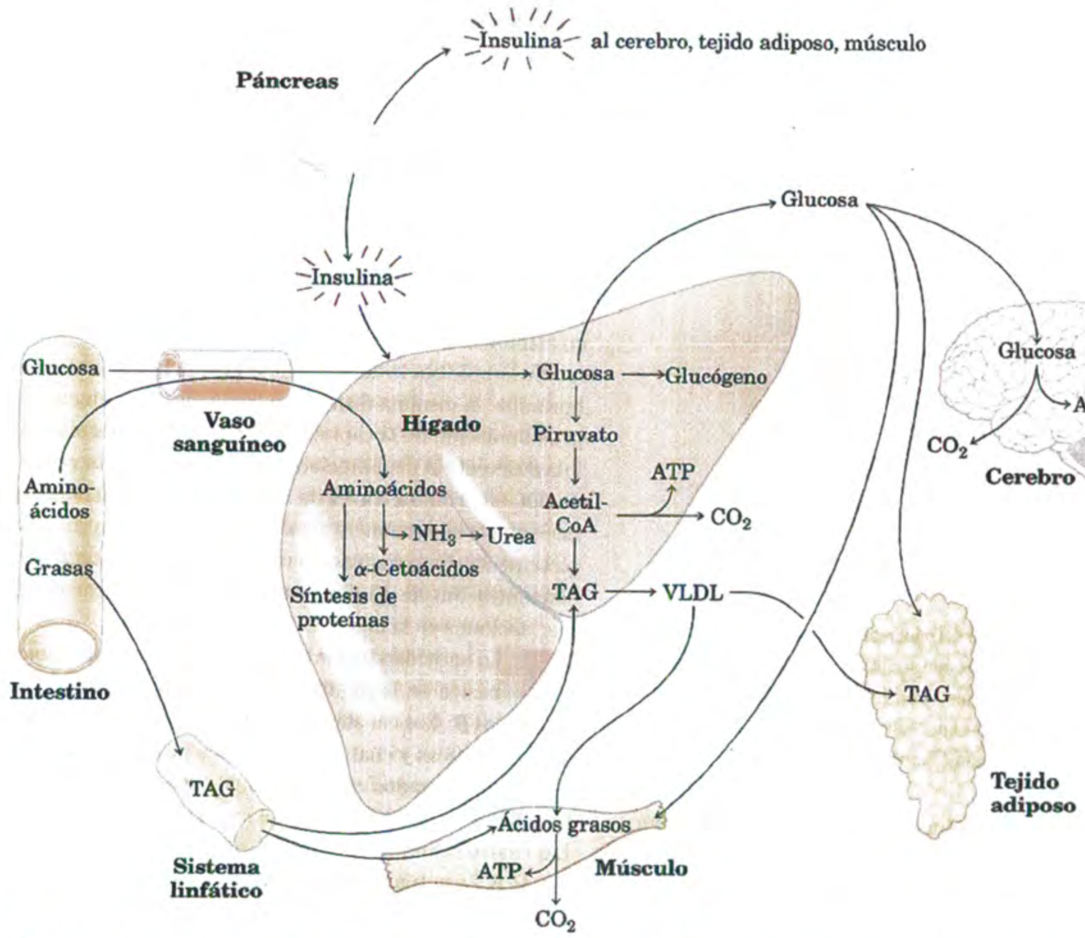


FIGURA 23–26 Testado de buena nutrición: el hígado lipogénico. Inmediatamente después de una comida rica en calorías, la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos entran en el hígado. La insulina liberada en respuesta a la elevada concentración de glucosa en sangre estimula la captación de glucosa por los tejidos. Parte de la glucosa se exporta al cerebro para cubrir sus necesidades energéticas y parte a los tejidos adiposo y muscular. En el hígado, el exceso de glucosa se oxida a acetil-CoA, que se utiliza para sintetizar ácidos grasos para su exportación en forma de triacilgliceroles en las VLDL a los tejidos adiposo y muscular. El NADPH para la síntesis de lípidos se obtiene de la oxidación de la glucosa en la ruta de las pentosas fosfato. Los aminoácidos en exceso se convierten en piruvato y acetil-CoA, que también se utilizan para la síntesis de lípidos. Las grasas de la dieta se transportan vía sistema linfático, en forma de quilomicrones desde el intestino a los tejidos muscular y adiposo.

TABLA 23–3 Efecto de la insulina sobre la glucosa sanguínea: captación de glucosa por las células y almacenamiento como triacilgliceroles y glucógeno

Efecto metabólico	Enzima diana
↑ Captación de glucosa (músculo, adiposo)	↑ Transportador de glucosa (GLUT4)
↑ Captación de glucosa (hígado)	↑ Glucoquinasa (aumento de la expresión)
↑ Síntesis de glucógeno (hígado, músculo)	↑ Glucógeno sintasa
↓ Degradación de glucógeno (hígado, músculo)	↓ Glucógeno fosforilasa
↑ Glucólisis, producción de acetil-CoA (hígado, músculo)	↑ PFK-1 (por ↑ PFK-2) ↑ Complejo de la piruvato deshidrogenasa
↑ Síntesis de ácidos grasos (hígado)	↑ Acetil-CoA carboxilasa
↑ Síntesis de triacilgliceroles (tejido adiposo)	↑ Lipoproteína lipasa

Las células β del páncreas secretan insulina en respuesta a cambios de la glucosa en sangre

Cuando la glucosa llega a la circulación sanguínea desde el intestino, después de una comida rica en glúcidos, el consiguiente aumento de glucosa en sangre provoca un aumento de la secreción de insulina (y una disminución de la secreción de glucagón) por el páncreas. La liberación de insulina está regulada en gran parte por el nivel de glucosa de la sangre que llega al páncreas. Las hormonas peptídicas insulina, glucagón y somatostatina se producen en agrupamientos de células pancreáticas especializadas, los islotes de Langerhans **(Fig. 23–27)**. Cada

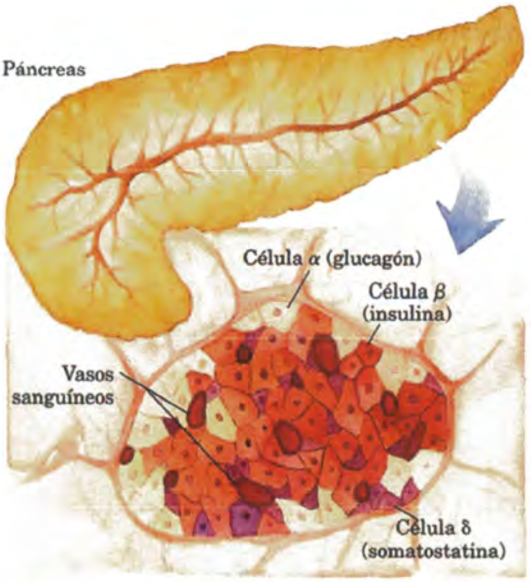


FIGURA 23–27 El sistema endocrino del páncreas. Además de las células exocrinas o acinares (véase la Fig. 18–3b), que secretan enzimas digestivos en forma de zimógenos, el páncreas contiene agrupamientos de células endocrinas, los islotes de Langerhans. Los islotes contienen células α, β, y δ, cada una de las cuales segrega una hormona peptídica específica.

tipo de célula de los islotes produce una sola hormona: las células α producen glucagón, las β insulina y las δ somatostatina.

Como se muestra en la **Figura 23–28**, cuando aumenta la glucosa sanguínea ① los transportadores GLUT2 introducen glucosa en las células β, donde se convierte inmediatamente en glucosa 6-fosfato por la hexoquinasa IV (glucoquinasa) y entra en la glucólisis. El incremento en la velocidad del catabolismo de la glucosa aumenta la [ATP]②, lo que hace que se cierren los **canales de K^+ regulados por ATP** de la membrana plasmática. ③La reducción en la salida de K^+ despolariza la membrana. (Recuerde de la Sección 12.6 que la salida de K^+ a través de un canal abierto de K^+ hiperpolariza la membrana; por lo tanto, el cierre del canal de K^+ despolariza de modo efectivo la membrana.) La despolarización de la membrana abre los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje. La consiguiente entrada ④ de Ca^{2+} provoca la liberación de insulina por exocitosis ⑤. Estímulos procedentes de los sistemas nerviosos parasimpático y simpático estimulan e inhiben, respectivamente, la liberación de insulina. Un simple bucle de retroalimentación limita la liberación de hormona: la insulina disminuye la glucosa sanguínea mediante la estimulación de la captación de glucosa por los tejidos; la célula β detecta la disminución de glucosa en sangre por la disminución en el flujo a través de la reacción de la hexoquinasa; ello hace que la liberación de insulina se haga más lenta o cese completamente. Esta regulación por retroalimentación mantiene la concentración de glucosa casi constante a pesar de grandes fluctuaciones en la ingesta.

La actividad de los canales de K^+ regulados por ATP es básica en la regulación de la secreción de insulina por las células β. Los canales son octámeros de cuatro subunidades Kir6.2 idénticas y cuatro subunidades SUR1 también idénticas, y están organizados como los canales de K^+ de las bacterias y las células eucarióticas (véanse las Fig. 11–48, 11–49 y 11–50). Las cuatro subunidades Kir6.2 forman un cono alrededor del canal de K^+ y actúan de filtro selectivo y de mecanismo regulado por ATP (**Fig. 23–29**). Cuando aumenta la concentración de ATP (aumento de la glucosa en sangre), los canales de K^+ se cierran, se despolariza la membrana plasmática y se desencadena la liberación de insulina, como indica la Figura 23–28.

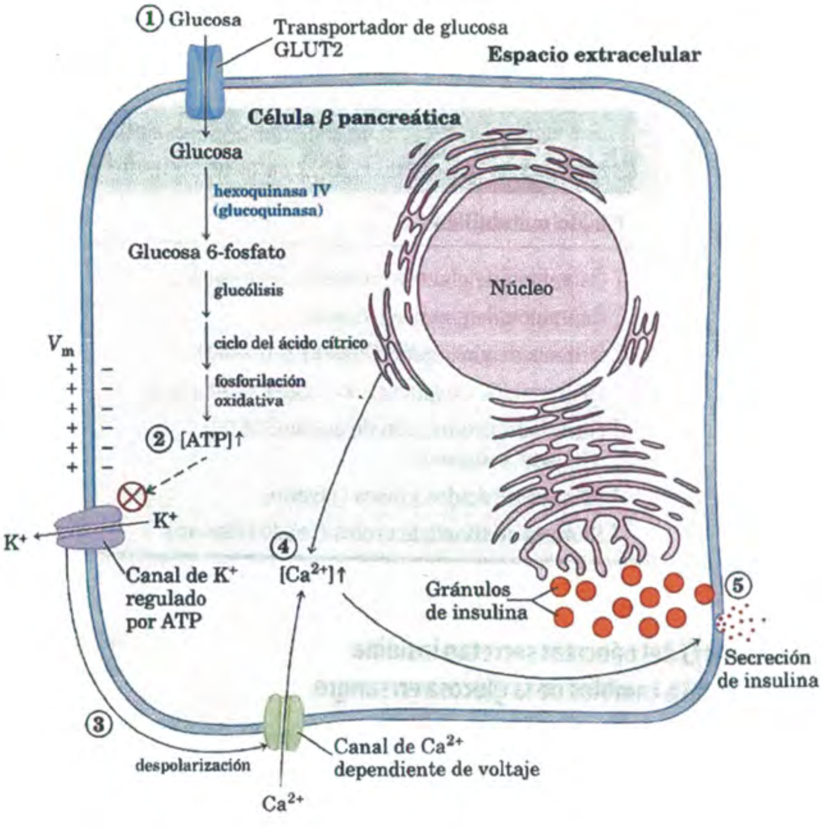


FIGURA 23–28 Regulación por la glucosa de la secreción de insulina por las células β pancreáticas. Cuando el nivel de glucosa en sangre es alto, el metabolismo activo de la glucosa en las células β eleva la [ATP] intracelular, lo que provoca el cierre de los canales de K^+ de la membrana plasmática y su despolarización consiguiente. En respuesta al cambio en el potencial de membrana, se abren canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, lo que permite el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. (El Ca^{2+} también es liberado por el retículo endoplasmático, en respuesta a la elevación inicial de $[Ca^{2+}]$ en el citosol.) La $[Ca^{2+}]$ citosólica es ahora suficientemente elevada para provocar la liberación de insulina por exocitosis. Los procesos numerados se discuten en el texto.

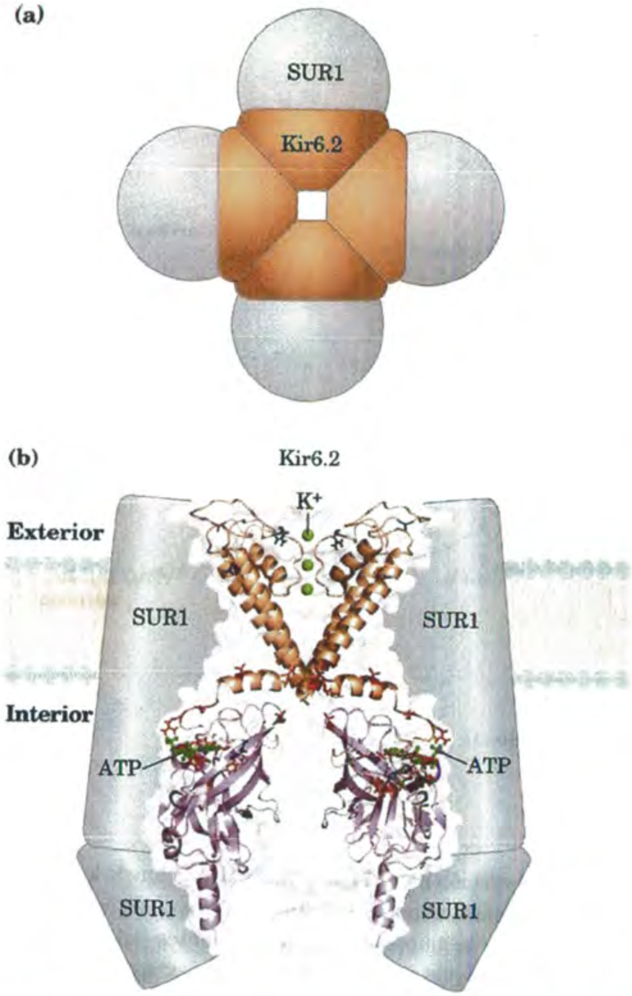
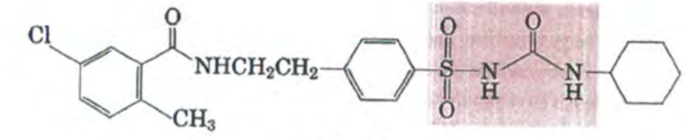


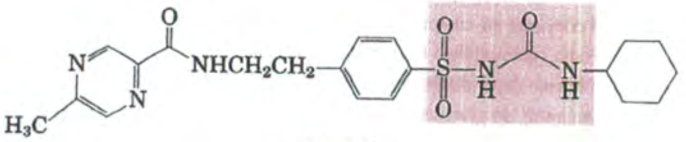
FIGURA 23–29 Canales de K^+ controlados por ATP en las células β **(a)** Estructura octamérica del canal vista perpendicularmente a la membrana. El canal está formado por cuatro subunidades Kir6.2 idénticas y en el exterior se encuentran las cuatro subunidades SUR1 (receptor de la sulfonilurea). **(b)** Estructura de la porción Kir6.2 del canal vista en el plano de la membrana. En aras de la claridad sólo se muestran dos dominios transmembrana y dos dominios citosólicos. Se muestran tres iones K^+ (verde) en la región del filtro de selectividad. La mutación de ciertos aminoácidos (en rojo) provoca diabetes neonatal; la mutación de otros (azul) provoca hiperinsulinismo infantil. Esta estructura (las coordenadas han sido amablemente cedidas por Frances Ashford y colaboradores de la Universidad de Oxford) no fue obtenida directamente por cristalografía, sino por ajuste de la secuencia conocida de Kir6.2 a las estructuras cristalográficas del canal Kir bacteriano (KirBac1.1; PDB ID 1P7B) y los dominios amino y carboxilo de otra proteína Kir, Kir3.1 (PDB ID 1U4E). Compare esta estructura con el canal regulado de K^+ de la Figura 11–50.

Las **sulfonilureas,** medicamentos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 2, se unen a las subunidades SUR1 (*s*ulfonyl *u*rea *r*eceptor) de los canales de K^+, cerrando los canales y estimulando la liberación de insulina. La primera generación de estos fármacos (tolbutamida, por ejemplo) se desarrolló en la década de 1950. La segunda generación de fármacos, entre los que se encuentran gliburida (Micronase), glipizida (Glucotrol) y glimepirida (Amaryl), son más potentes y tienen menos efectos secundarios. (La porción de sulfonilurea está destacada en rosa en las siguientes estructuras.)

Las sulfonilureas a veces se usan junto con insulina inyectada, pero a menudo son suficientes por sí solas para controlar la diabetes de tipo 2.



Gliburida



Glipizida

Las mutaciones en los canales de K^+ controlados por ATP de las células β son afortunadamente raras. Las mutaciones en Kir6.2 que resultan en la *apertura* permanente de los canales de K^+ (residuos en rojo de la Fig. 23–29b) causan diabetes mellitus neonatal con hiperglucemia grave que requiere terapia con insulina. Otras mutaciones en Kir6.2 o SUR1 (residuos azules en la Fig. 23–29b) provocan el *cierre* permanente de los canales de K^+ y la liberación continua de insulina. De no ser tratados, los individuos con estas mutaciones desarrollan hiperinsulinemia congénita (hiperinsulinismo de la infancia); el exceso de insulina causa hipoglucemia grave (glucosa en sangre baja), que provoca daños irreversibles en el cerebro. Un tratamiento efectivo consiste en la extirpación de parte del páncreas para reducir la producción de insulina. ■

El glucagón contrarresta los niveles bajos de glucosa en sangre

Varias horas después de la ingestión de glúcidos en la dieta, los niveles de glucosa en sangre disminuyen algo a causa de la oxidación constante de glucosa por el cerebro y otros tejidos. La disminución de glucosa en sangre desencadena la secreción de **glucagón** y disminuye la liberación de insulina **(Fig. 23–30)**.

El glucagón provoca un aumento de la concentración de glucosa en sangre por varias vías (Fig. 23–4). Al igual que la adrenalina, el glucagón estimula la degradación neta del glucógeno hepático al activar la glucógeno fosforilasa e inactivar la glucógeno sintasa; ambos efectos son el resultado de la fosforilación, inducida por cAMP, de los enzimas regulables. El glucagón inhibe la degradación de la glucosa por la vía glucolítica en el hígado y estimula la síntesis de glucosa por la vía gluconeogénica. Ambos efectos son el resultado de la disminución de los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato, un inhibidor alostérico del enzima gluconeogénico fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) y activador de la fosfofructoquinasa-1. Recuerde que la [fructosa 2,6-bisfosfato] está controlada en último término por una reacción de fosforilación de una proteína dependiente de cAMP (véase la Fig. 15–17). El glucagón también inhibe el enzima glucolítico piruvato quinasa (promoviendo su fosforilación dependiente de cAMP), y así bloquea la conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato e impide la oxidación del piruvato por la vía del ciclo del ácido cítrico; la acumulación resul-

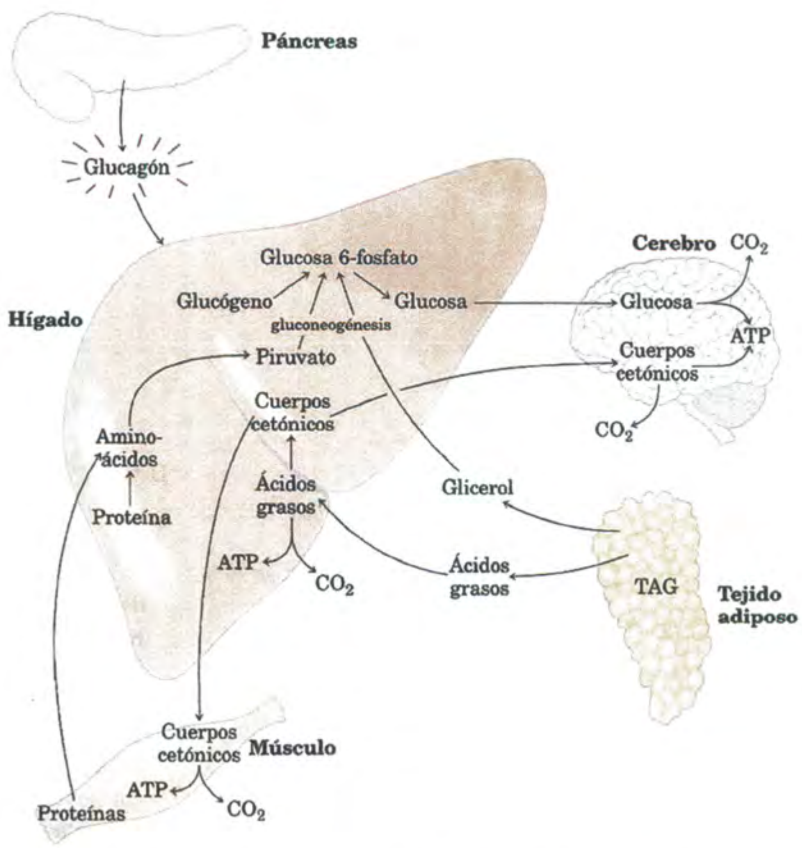


FIGURA 23–30 Estado de ayuno: el hígado glucogénico. Después de unas cuantas horas sin comer, el hígado se convierte en la principal fuente de glucosa para el cerebro. Se degrada el glucógeno hepático y la glucosa 1-fosfato producida se convierte en glucosa 6-fosfato y, a continuación, en glucosa libre, que se libera al torrente circulatorio. Los aminoácidos procedentes de la degradación de proteínas en el hígado y en el músculo y el glicerol de la degradación de los TAG en el tejido adiposo se utilizan para la gluconeogénesis. El hígado utiliza ácidos grasos como combustible principal, y el exceso de acetil-CoA se convierte en cuerpos cetónicos para su exportación como combustible a otros tejidos; el cerebro es especialmente dependiente de este combustible cuando el suministro de glucosa es escaso (véase la Fig. 23–22).

tante de fosfoenolpiruvato favorece la gluconeogénesis. Este efecto es potenciado por la estimulación de la síntesis del enzima gluconeogénico PEP carboxiquinasa por el glucagón. Estimulando la degradación del glucógeno, inhibiendo la glucólisis y promoviendo la gluconeogénesis en los hepatocitos, el glucagón hace posible que el hígado exporte glucosa a la sangre restableciendo los valores normales de glucosa en sangre.

Aunque su diana principal es el hígado, el glucagón (al igual que la adrenalina) también afecta al tejido adiposo, donde activa la degradación de TAG al promover la fosforilación dependiente de cAMP de la perilipina y de la lipasa sensible a hormonas. Una vez activada, esta lipasa libera ácidos grasos libres, que se envían al hígado y a otros tejidos para ser utilizados como combustible, reservando así la glucosa para el cerebro. El efecto neto del glucagón es pues la estimulación de la síntesis de glucosa y su liberación por el hígado y la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo, para ser utilizados como combustible en lugar de la glucosa por tejidos distintos del cerebro (Tabla 23–4). Todos estos efectos del glucagón están facilitados por la fosforilación de proteínas dependiente de cAMP.

Durante el ayuno y la inanición el metabolismo se modifica para proporcionar combustible para el cerebro

Las reservas energéticas de un ser humano adulto sano son de tres tipos: glucógeno almacenado en el hígado y en el músculo en cantidades relativamente pequeñas, grandes cantidades de triacilgliceroles en el tejido adiposo y proteínas tisulares, que pueden degradarse en caso de que sea necesario para proporcionar combustible (Tabla 23–5).

TABLA 23–4 Efectos del glucagón sobre la glucosa sanguínea: producción y liberación de glucosa por el hígado

Efecto metabólico	Efecto sobre el metabolismo de la glucosa	Enzima diana
↑ Degradación del glucógeno (hígado)	Glucógeno ⟶ glucosa	↑ Glucógeno fosforilasa
↓ Síntesis del glucógeno (hígado)	Menos glucosa almacenada como glucógeno	↓ Glucógeno sintasa
↓ Glucólisis (hígado)	Menos glucosa como combustible en el hígado	↓ PFK-1
↑ Gluconeogénesis (hígado)	Aminoácidos, Glicerol, Oxalacetato } ⟶ glucosa	↑ FBPasa-2 ↓ Piruvato quinasa ↑ PEP carboxiquinasa
↑ Movilización de ácidos grasos (tejido adiposo)	Menos glucosa utilizada como combustible en el hígado y el músculo	↑ Lipasa sensible a hormonas ↑ PKA (perilipina—Ⓟ)
↑ Cetogénesis	Proporciona una alternativa a la glucosa como fuente de energía para el cerebro	↓ Acetil-CoA carboxilasa

TABLA 23–5 Disponibilidad de combustibles metabólicos en un hombre normal de 70 kg y en un hombre obeso de 140 kg en el inicio de un ayuno

Fuente energética	Peso (kg)	Equivalente calórico (miles de kcal (kJ))	Tiempo de supervivencia previsible (meses)*
Peso normal, hombre de 70 kg			
Triacilgliceroles (tejido adiposo)	15	141 (589)	
Proteínas (principalmente en músculo)	6	24 (100)	
Glucógeno (músculo, hígado)	0,225	0,90 (3,8)	
Combustibles en circulación (glucosa, ácidos grasos, triacilgliceroles, etc.)	0,023	0,10 (0,42)	
Total		166 (694)	3
Hombre obeso de 140 kg			
Triacilgliceroles (tejido adiposo)	80	752 (3.140)	
Proteínas (principalmente en músculo)	8	32 (134)	
Glucógeno (músculo, hígado)	0,23	0,92 (3,8)	
Combustibles en circulación	0,025	0,11 (0,46)	
Total		785 (3.280)	14

*El tiempo de supervivencia se ha calculado suponiendo un consumo basal de energía de 1.800 kcal/día.

En las primeras dos horas después de una comida, el nivel de glucosa en sangre disminuye ligeramente y los tejidos reciben glucosa liberada del glucógeno hepático. No hay síntesis, o muy poca, de lípidos. Unas cuatro horas después de la comida, la glucosa sanguínea ha continuado disminuyendo, la secreción de insulina se ha reducido y ha aumentado la secreción de glucagón. Estas señales hormonales movilizan los triacilgliceroles, que se convierten ahora en el combustible principal para el músculo y el hígado. La **Figura 23–31** muestra las respuestas al ayuno prolongado. ① Para proporcionar glucosa al cerebro, el hígado degrada ciertas proteínas (las menos necesarias para un organismo que no ingiere comida). Sus aminoácidos no esenciales son transaminados o desaminados (Capítulo 18) y ② el exceso de grupos amino se convierte en urea que se exporta a través de la circulación sanguínea hasta el riñón, donde se excreta.

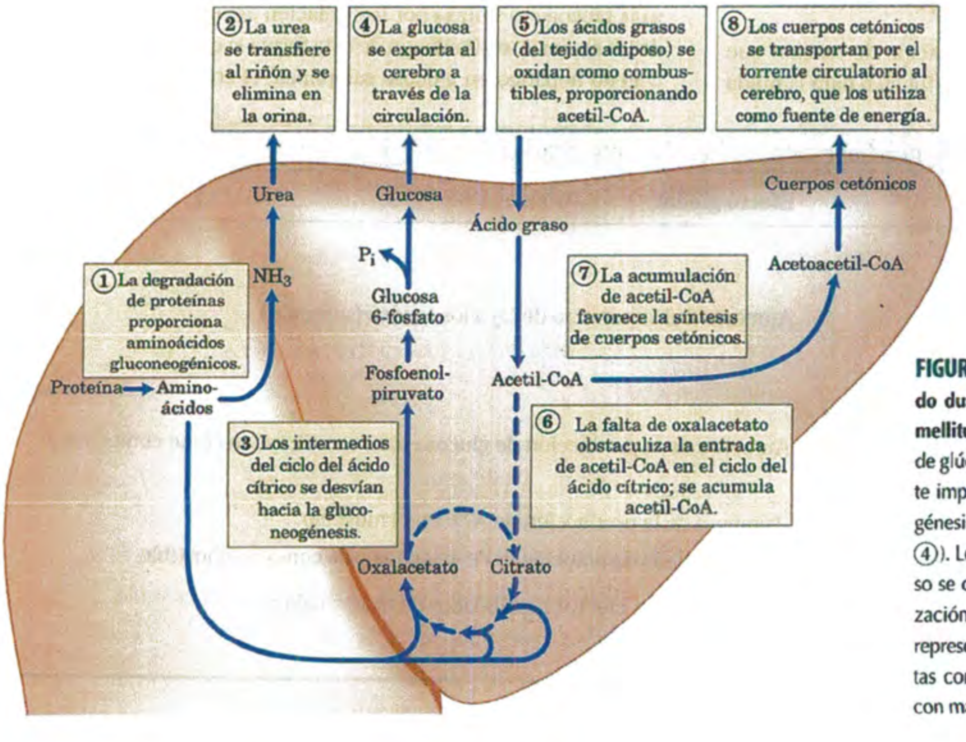


FIGURA 23–31 Metabolismo energético en el hígado durante el ayuno prolongado o en la diabetes mellitus descontrolada. Tras consumirse las reservas de glúcidos, las proteínas se convierten en una fuente importante de glucosa, producida por gluconeogénesis a partir de aminoácidos glucogénicos (① a ④). Los ácidos grasos procedentes del tejido adiposo se convierten en cuerpos cetónicos para su utilización por el cerebro (⑤ a ⑧). Las flechas a trazos representan reacciones con un flujo reducido en estas condiciones. Los diferentes pasos se describen con más detalle en el texto.

También en el hígado, los esqueletos carbonados de los aminoácidos glucogénicos se convierten en piruvato o en intermedios del ciclo del ácido cítrico. ③ Estos intermedios (así como el glicerol derivado de los TAG en el tejido adiposo) proporcionan la materia prima para la gluconeogénesis en el hígado, ④ que produce glucosa para el cerebro. ⑤ Los ácidos grasos se oxidan a acetil-CoA, pero la utilización de intermedios del ciclo del ácido cítrico para la gluconeogénesis agota el oxalacetato, imposibilitando la entrada de acetil-CoA en el ciclo ⑥. La consiguiente acumulación de acetil-CoA favorece ⑦ la formación de acetoacetil-CoA y cuerpos cetónicos. Tras unos pocos días de ayuno, los niveles de cuerpos cetónicos en la sangre aumentan **(Fig. 23–32)** a medida que el hígado exporta estos combustibles al corazón, al músculo esquelético y al cerebro, que los usan en lugar de la glucosa (Fig. 23–31, ⑧).

El acetil-CoA es un regulador crítico del destino del piruvato; inhibe alostéricamente la piruvato deshidrogenasa y estimula la piruvato carboxilasa (véase la Fig. 15–20). De esta forma, el acetil-CoA impide su propia producción a partir del piruvato, a la vez que estimula la conversión del piruvato en oxalacetato, primer paso de la gluconeogénesis.

Los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo de un adulto de peso normal podrían proporcionar suficiente energía para mantener una tasa basal del metabolismo durante unos tres meses; un adulto muy obeso puede tener suficiente energía almacenada para soportar un ayuno de más de un año (Tabla 23–5). Cuando se han agotado las reservas de grasa, empieza la degradación de proteínas esenciales, con la consiguiente pérdida de las funciones cardíaca y hepática y finalmente la muerte. La grasa almacenada puede suministrar suficiente energía (calorías) durante el ayuno o una dieta estricta, pero es necesario un adecuado suministro de vitaminas y minerales así como suficientes aminoácidos glucogénicos para reemplazar a los que son usados para la gluconeogénesis. Las raciones de las personas sometidas a una dieta adelgazante se complementan normalmente con vitaminas, minerales y aminoácidos o proteínas.

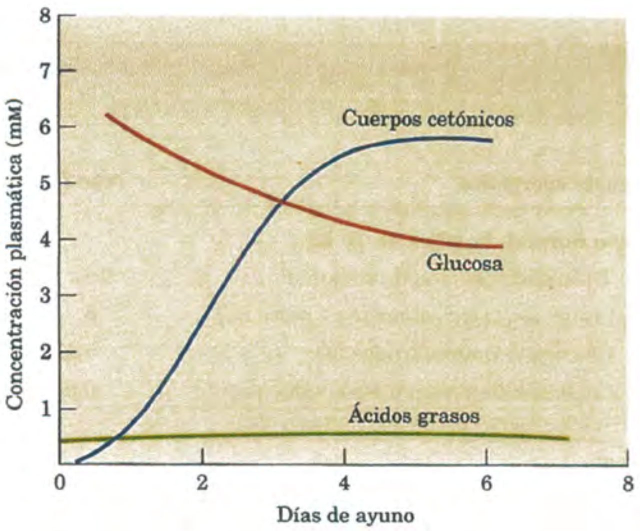


FIGURA 23–32 Concentración de ácidos grasos, glucosa y cuerpos cetónicos en el plasma durante la primera semana de inanición. A pesar de los mecanismos hormonales existentes para mantener el nivel de glucosa en sangre, éste empieza a disminuir a partir del segundo día de ayuno. El nivel de cuerpos cetónicos, casi indetectable antes del ayuno, aumenta de forma espectacular después de 2 a 4 días de ayuno. Estas cetonas hidrosolubles, el acetoacetato y el β-hidroxibutirato, suplementan la glucosa como fuente de energía durante un ayuno prolongado. El cerebro no puede utilizar los ácidos grasos como combustible; no cruzan la barrera hematoencefálica.

La adrenalina es la señal de una actividad inminente

Cuando un animal se enfrenta a una situación de tensión que requiere un aumento de actividad, para la lucha o para la huída en casos extremos, señales neuronales que parten del cerebro desencadenan la liberación de adrenalina y noradrenalina por la médula suprarrenal. Ambas hormonas dilatan las vías respiratorias para facilitar la captación de O_2, incrementan la frecuencia e intensidad de los latidos cardíacos y aumentan la presión sanguínea, promoviendo en consecuencia el flujo de O_2 y de combustibles a los tejidos (Tabla 23–6).

La adrenalina actúa principalmente sobre el músculo, el tejido adiposo y el hígado. Activa la glucógeno fosforilasa e inactiva la glucógeno sintasa por fosforilación dependiente de cAMP de los enzimas, estimulando de esta forma la conversión del glucógeno hepático en glucosa sanguínea, el combustible para el

TABLA 23–6 Efectos fisiológicos y metabólicos de la adrenalina: preparación para la acción

Efecto inmediato	Efecto global
Fisiológico	
↑ Frecuencia cardíaca ↑ Presión sanguínea ↑ Dilatación de los conductos respiratorios	Aumento del suministro de O_2 a los tejidos (músculo)
Metabólico	
↑ Degradación de glucógeno (músculo, hígado) ↓ Síntesis de glucógeno (músculo, hígado) ↑ Gluconeogénesis (hígado)	Aumento de la producción de glucosa para su utilización como combustible
↑ Glucólisis (músculo)	Aumento de la producción de ATP en el músculo
↑ Movilización de ácidos grasos (tejido adiposo)	Aumento de la disponibilidad de ácidos grasos como combustible
↑ Secreción de glucagón ↓ Secreción de insulina	Refuerzo de los efectos metabólicos de la adrenalina

trabajo muscular anaeróbico. La adrenalina también estimula la degradación anaeróbica del glucógeno del músculo por fermentación hasta ácido láctico, estimulando así la formación glucolítica de ATP. La estimulación de la glucólisis se consigue aumentando la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, un potente activador alostérico del enzima glucolítico clave, la fosfofructoquinasa-1 (véanse las Figs. 15–16 y 15–17). La adrenalina también estimula la movilización de grasas en el tejido adiposo, activando la lipasa sensible a hormonas (por fosforilación dependiente de cAMP) y desplazando la perilipina que cubre la superficie de la gotícula lipídica (véase la Fig. 17–3). Finalmente, la adrenalina estimula la secreción de glucagón e inhibe la secreción de insulina, reforzando así su efecto movilizador de combustibles y frenando su almacenamiento.

El cortisol es un indicador de estrés, incluidos los bajos niveles de glucosa en sangre

Una amplia variedad de agentes estresantes (ansiedad, miedo, dolor, hemorragia, infecciones, bajo nivel de glucosa en sangre, inanición) estimulan la liberación de la hormona corticosteroide **cortisol** por la corteza suprarrenal. El cortisol actúa sobre el músculo, el hígado y el tejido adiposo para suministrar al organismo el combustible necesario para afrontar el estrés. El cortisol es una hormona de acción relativamente lenta que altera el metabolismo cambiando los tipos y las cantidades de ciertos enzimas sintetizados en sus células diana, en lugar de regular la actividad de moléculas enzimáticas ya existentes.

En el tejido adiposo, el cortisol provoca un aumento de la liberación de ácidos grasos de los TAG de reserva. Los ácidos grasos se exportan para ser utilizados como combustible por otros tejidos, y el glicerol se utiliza para la gluconeogénesis en el hígado. El cortisol estimula la degradación de proteínas musculares y la exportación de aminoácidos al hígado, donde sirven de precursores para la gluconeogénesis. En el hígado, el cortisol estimula la gluconeogénesis al promover la síntesis del enzima clave PEP carboxiquinasa (véase la Fig. 14–17b); el glucagón tiene el mismo efecto, mientras que la insulina tiene el efecto contrario. La glucosa producida por esta vía se almacena en el hígado en forma de glucógeno o se exporta inmediatamente a los tejidos que necesitan glucosa como combustible. El efecto neto de estos cambios metabólicos es restablecer los niveles normales de glucosa en sangre y almacenar glucógeno para favorecer la respuesta de lucha o de huída normalmente asociada al estrés. Los efectos del cortisol, por lo tanto, contrarrestan los de la insulina. Durante largos períodos de estrés, la liberación continuada de cortisol pierde su valor adaptativo positivo y empieza a causar daños al músculo y al hueso y a perjudicar las funciones inmunes y endocrinas.

La diabetes mellitus es un defecto en la producción o en la acción de la insulina

La **diabetes mellitus** es una enfermedad relativamente común: alrededor de un 6% de la población de Estados Unidos muestra algún grado de anormalidad en el metabolismo de la glucosa, indicativa de diabetes o de una tendencia a padecerla. Hay dos formas clínicas principales de diabetes mellitus: **diabetes tipo 1,** a veces denominada diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), y **diabetes tipo 2,** o diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), también denominada diabetes resistente a la insulina.

La diabetes tipo 1 aparece de forma temprana y se agrava rápidamente. Esta enfermedad responde a la inyección de insulina, porque el defecto metabólico procede de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas y la consiguiente incapacidad de producir suficiente insulina. La diabetes de tipo 1 requiere una terapia basada en la administración de insulina y en un cuidadoso control de por vida del equilibrio entre la ingestión de glucosa y la dosis de insulina. Síntomas característicos de la diabetes tipo 1 (y del tipo 2) son la sed excesiva y la micción frecuente (poliuria), que provocan la ingestión de grandes cantidades de agua (polidipsia) ("diabetes mellitus" significa "excreción excesiva de orina dulce"). Estos síntomas se deben a la excreción de grandes cantidades de glucosa en la orina, situación conocida como **glucosuria.**

La diabetes de tipo 2 es de desarrollo lento (típicamente en individuos mayores y obesos), y los síntomas son menos graves y a menudo pasa desapercibida al principio. En realidad, éste es un grupo de enfermedades en el que la actividad reguladora de la insulina es defectuosa: se produce insulina, pero alguna característica del sistema de respuesta a la insulina es defectuosa. Estos individuos son insulinoresistentes. La conexión entre la diabetes tipo 2 y la obesidad (discutida más adelante) constituye un área de investigación muy dinámica.

Los individuos con cualquiera de los dos tipos de diabetes son incapaces de captar eficientemente la glucosa de la sangre; recuérdese que la insulina provoca el desplazamiento de los transportadores de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática del músculo y del tejido adiposo (véase la Fig. 12–16). Otro cambio metabólico característico en la diabetes es la oxidación excesiva pero incompleta de los ácidos grasos en el hígado. El acetil-CoA producido por la β-oxidación no puede ser oxidado completamente por el ciclo del ácido cítrico, ya que la elevada proporción [NADH]/[NAD$^+$] producida por la β-oxidación inhibe el ciclo (recuérdese que hay tres pasos del ciclo que convierten el NAD$^+$ en NADH). La acumulación de acetil-CoA ocasiona una sobreproducción de cuerpos cetónicos, acetoacetato y β-hidroxibutirato, que no pueden ser utilizados por los tejidos extrahepáticos tan deprisa como los produce el hígado. Además de β-hidroxibutirato y acetoacetato, la sangre de los diabéticos también contiene acetona, resultado de la descarboxilación espontánea del acetoacetato:

$$\underset{\textbf{Acetoacetato}}{H_3C-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-CH_2-COO^-} + H_2O \longrightarrow \underset{\textbf{Acetona}}{H_3C-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-CH_3} + HCO_3^-$$

La acetona es volátil y se exhala, dando un olor característico al aliento de un diabético no controlado, a veces confundido con el etanol. Un diabético que muestra confusión mental debido a los niveles muy elevados de glucosa en sangre puede recibir ocasionalmente un diagnóstico de etilismo, un error que puede resultar fatal. La sobreproducción de cuerpos cetónicos, denominada **cetosis,** se manifiesta por un gran aumento en las

concentraciones de cuerpos cetónicos en sangre (cetonemia) y en orina (cetonuria).

Los cuerpos cetónicos son ácidos carboxílicos que se ionizan liberando protones. En la diabetes no controlada esta producción de ácidos puede rebasar la capacidad amortiguadora del sistema del bicarbonato de la sangre y producir una disminución del pH sanguíneo, denominada **acidosis,** o en combinación con la cetosis, **cetoacidosis,** una situación potencialmente peligrosa para la vida.

Los análisis bioquímicos de muestras de sangre y de orina son esenciales para el diagnóstico y el tratamiento de la diabetes. Un criterio diagnóstico sensible lo constituye la **prueba de tolerancia a la glucosa.** Después de una noche sin ingerir alimentos, el paciente bebe una dosis de 100 g de glucosa disuelta en un vaso de agua. Se mide la concentración de glucosa en sangre antes del ensayo y a intervalos de 30 minutos durante varias horas después de la ingestión. Un individuo sano asimila la glucosa rápidamente y los niveles de glucosa en sangre no aumentan más allá de 9 o 10 mM; en la orina aparece poca o ninguna glucosa. Los individuos diabéticos muestran una marcada deficiencia en la asimilación de la dosis de glucosa; sus niveles de glucosa en sangre aumentan espectacularmente y vuelven al nivel de ayuno muy lentamente. Dado que los niveles de glucosa sanguínea están muy por encima del umbral renal (alrededor de 10 mM), también aparece glucosa en la orina. ■

RESUMEN 23.3 Regulación hormonal del metabolismo energético

- La concentración de glucosa en sangre está controlada por hormonas. Las fluctuaciones en la glucosa sanguínea (que normalmente se encuentra entre 60 y 90 mg/100 mL o alrededor de 4,5 mM), debidas a la ingestión de alimentos o al ejercicio intenso, se compensan con cambios inducidos por hormonas en el metabolismo de varios órganos.
- Los niveles elevados de glucosa en sangre estimulan la liberación de insulina, que acelera la captación de glucosa por los tejidos y favorece el almacenamiento de combustibles en forma de glucógeno y triacilgliceroles, a la vez que inhibe la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo.
- Unos niveles de glucosa en sangre reducidos provocan la liberación de glucagón, que estimula la liberación de glucosa a partir del glucógeno hepático y desvía el metabolismo energético en el hígado y el músculo hacia la oxidación de ácidos grasos, ahorrando glucosa para su utilización por el cerebro. Durante el ayuno prolongado los triacilgliceroles se convierten en la principal fuente de energía; el hígado transforma los ácidos grasos en cuerpos cetónicos que se exportan a otros tejidos, entre ellos el cerebro.
- La adrenalina prepara el organismo para un aumento de actividad, movilizando glucosa a partir de glucógeno y otros precursores y liberándola a la sangre.
- El cortisol, liberado en respuesta a un variedad de diversos agentes estresantes (entre ellos una baja glucosa sanguínea), estimula la gluconeogénesis en el hígado a partir de aminoácidos y glicerol, lo que produce el aumento de la glucosa sanguínea, en oposición al efecto de la insulina.
- En la diabetes, la insulina no es producida o no es reconocida por los tejidos, de forma que se hace difícil la captación de la glucosa. Cuando los niveles de glucosa en sangre son altos, se excreta glucosa. Los tejidos pasan a depender entonces de los ácidos grasos como combustible (produciendo cuerpos cetónicos) y degradan proteínas celulares para fabricar glucosa a partir de los aminoácidos glucogénicos. La diabetes no controlada se caracteriza por niveles elevados de glucosa en la sangre y en la orina y por la producción y excreción de cuerpos cetónicos.

23.4 Obesidad y regulación de la masa corporal

En la población de Estados Unidos, el 30% de los adultos son obesos, mientras que un 35% tienen sobrepeso, de acuerdo con el índice de masa corporal (IMC), calculado como peso en kg/(altura en m)^2. Un IMC por debajo de 25 se considera normal; un individuo con un IMC de 25 a 30 tiene sobrepeso; un IMC superior a 30 indica **obesidad.** La obesidad constituye un peligro para la vida. Aumenta significativamente las probabilidades de padecer diabetes tipo 2, así como ataques de corazón, embolias y cánceres del colon, mama, próstata y endometrio. En consecuencia, existe un gran interés en conocer de qué modo se regulan la masa corporal y el almacenamiento de grasas en el tejido adiposo. ■

En una primera aproximación, la obesidad es el resultado de ingerir más calorías en la dieta que las utilizadas en las actividades corporales que consumen energía. El cuerpo puede afrontar un exceso de calorías de la dieta de tres maneras: (1) convertir el exceso de combustible en grasa y almacenarla en el tejido adiposo, (2) quemar el exceso de combustible mediante ejercicio extra y (3) "malgastar" el combustible desviándolo hacia la producción de calor (termogénesis) en mitocondrias desacopladas. En los mamíferos actúa un conjunto complejo de señales hormonales y neuronales para mantener el equilibrio entre la ingestión de combustible y el gasto energético, con objeto de mantener la cantidad de tejido adiposo dentro de unos límites adecuados. Para tratar la obesidad de forma efectiva es necesario comprender los diferentes controles y equilibrios en condiciones normales y por qué fallan estos mecanismos homeostáticos en la obesidad.

El tejido adiposo tiene importantes funciones endocrinas

Una primera hipótesis para explicar la homeostasis de la masa corporal, el modelo de "retroalimentación negativa de la obesidad", postulaba la existencia de un mecanismo que inhibiría el apetito e incrementaría el consumo de energía cuando el peso corporal superase un cierto valor (el valor de referencia); la inhibición se levantaría cuando el peso corporal descendiese por debajo del valor de referencia (**Fig. 23–33**). Esta teoría predice que una señal procedente del tejido adiposo influye en los centros cerebrales que controlan el apetito y la actividad (metabólica y motora). El primer factor de este tipo, la leptina, se descubrió en 1994; sin embargo, posteriormente se ha puesto de manifiesto que el tejido adiposo es un importante órgano endocrino que produce hormonas peptídicas, conocidas como **adipoquinas.** Las adipoquinas pueden actuar localmente (ac-

FIGURA 23–33 Modelo del valor de referencia para el mantenimiento de una masa constante. Cuando aumenta la masa del tejido adiposo (línea de trazos), la leptina liberada inhibe el hambre y la síntesis de grasas y estimula la oxidación de ácidos grasos. Cuando disminuye la masa de tejido adiposo (línea continua), una menor producción de leptina favorece una ingesta mayor y una menor oxidación de ácidos grasos.

FIGURA 23–34 Un defecto en la producción de leptina causa obesidad. Los dos ratones tienen la misma edad y tienen defectos en el gen *OB*. Al ratón de la derecha se le administró leptina purificada mediante una inyección diaria y pesa 35 g. El ratón de la izquierda no recibió leptina, y como consecuencia comió más y fue menos activo; pesa 67 g.

ción autocrina y paracrina) o sistémicamente (acción endocrina), como transportadoras de información acerca de la idoneidad de las reservas energéticas (TAG) almacenadas en el tejido adiposo para otros tejidos y el cerebro. Normalmente las adipoquinas provocan cambios en el metabolismo energético y el comportamiento alimenticio que mantienen las reservas energéticas adecuadas y la masa corporal. La sobreproducción o subproducción de adipoquinas y la desregulación resultante pueden poner en peligro la vida.

La **leptina** (del griego *leptos*, "delgado") es una proteína pequeña (167 aminoácidos) que llega al cerebro, donde actúa sobre los receptores del hipotálamo que moderan el apetito. La leptina fue identificada originalmente como el producto del gen denominado *OB* (obeso) en ratones de laboratorio. Los ratones con dos copias defectuosas de este gen (genotipo *ob/ob*; las letras minúsculas indican una forma mutante del gen) muestran el comportamiento y la fisiología de animales en situación de ayuno permanente: sus niveles plasmáticos de cortisol son elevados, son incapaces de permanecer calientes, crecen anormalmente, no se reproducen y muestran un apetito ilimitado. Como consecuencia de este último efecto se convierten en gravemente obesos, con un peso hasta tres veces superior al de un ratón normal (**Fig. 23–34**). También tienen desarreglos metabólicos similares a los de los animales diabéticos, y son resistentes a la insulina. Cuando se les inyecta leptina los ratones *ob/ob*, pierden peso y aumentan su actividad locomotora y la termogénesis.

En los ratones se ha encontrado un segundo gen, designado *DB* (diabético), que también tiene un papel en la regulación del apetito. Los ratones con dos copias defectuosas (*db/db*) son obesos y diabéticos. El gen *DB* codifica el **receptor de leptina.** Cuando el receptor es defectuoso, se pierde la función señalizadora de la leptina.

El receptor de leptina se expresa principalmente en las regiones del cerebro que regulan el comportamiento alimenticio (las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo (**Fig. 23–35a**)).

La leptina vehicula el mensaje de que las reservas de grasa son suficientes y promueve una disminución de la ingestión de alimentos y un aumento del gasto energético. La interacción de la leptina con su receptor en el hipotálamo altera la emisión de señales neuronales a la región del cerebro que afecta al apetito. La

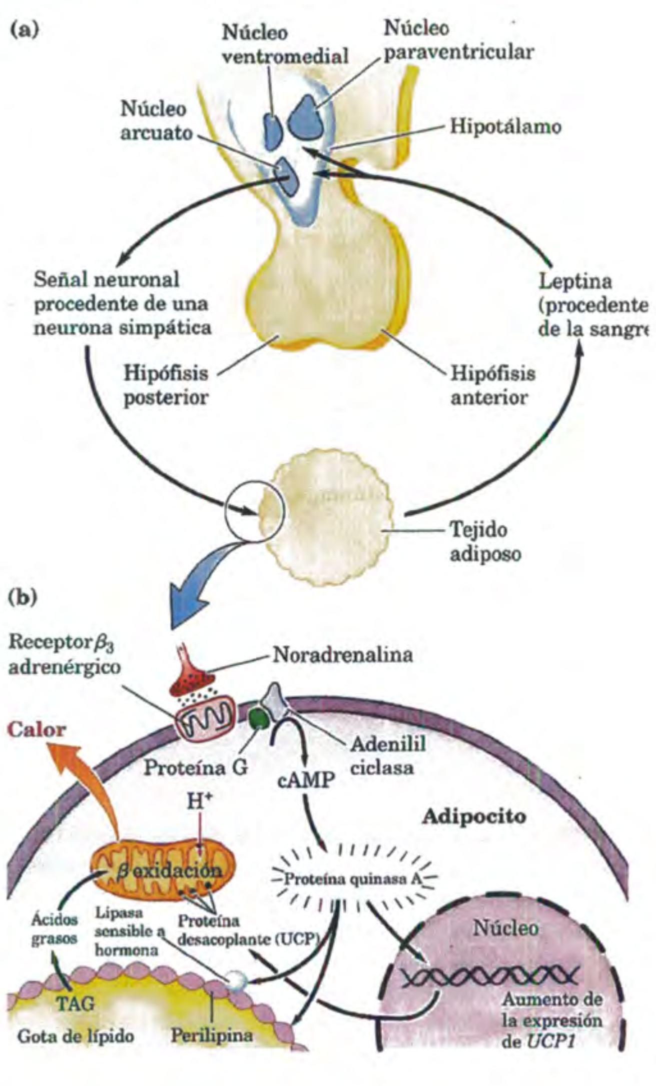


FIGURA 23–35 Regulación hipotalámica de la ingesta y gasto energético. **(a)** Anatomía del hipotálamo y su interacción con el tejido adiposo. **(b)** Detalle de la interacción entre el hipotálamo y un adipocito, explicada en el texto.

leptina también estimula al sistema nervioso simpático, aumentando la presión sanguínea, el ritmo cardíaco y la termogénesis mediante el desacoplamiento entre el transporte electrónico y la síntesis de ATP en las mitocondrias de los adipocitos blancos (Fig. 23–35b). Recuerde que la termogenina, o UCP, forma un canal en la membrana mitocondrial interna que permite que los protones entren de nuevo en la matriz mitocondrial sin pasar a través del complejo de la ATP sintasa. Ello permite la oxidación continua de combustible (ácidos grasos en un adipocito) sin síntesis de ATP, disipando la energía en forma de calor y consumiendo calorías de la dieta o grasas almacenadas en cantidades potencialmente muy grandes.

La leptina estimula la producción de hormonas peptídicas anorexigénicas

Dos tipos de neuronas del núcleo arcuato controlan la ingestión y el metabolismo de los combustibles **(Fig. 23–36)**. Las neuronas **orexigénicas** (que son estimuladoras del apetito) estimulan el apetito, produciendo y liberando el **neuropéptido Y (NPY)**, que hace que la siguiente neurona del circuito envíe al cerebro la señal ¡Come! El nivel sanguíneo de NPY aumenta durante la inanición, y está elevado en los ratones *ob/ob* y *db/db*. La elevada concentración de NPY probablemente sea la causa de la obesidad que presentan estos ratones, que comen de forma voraz.

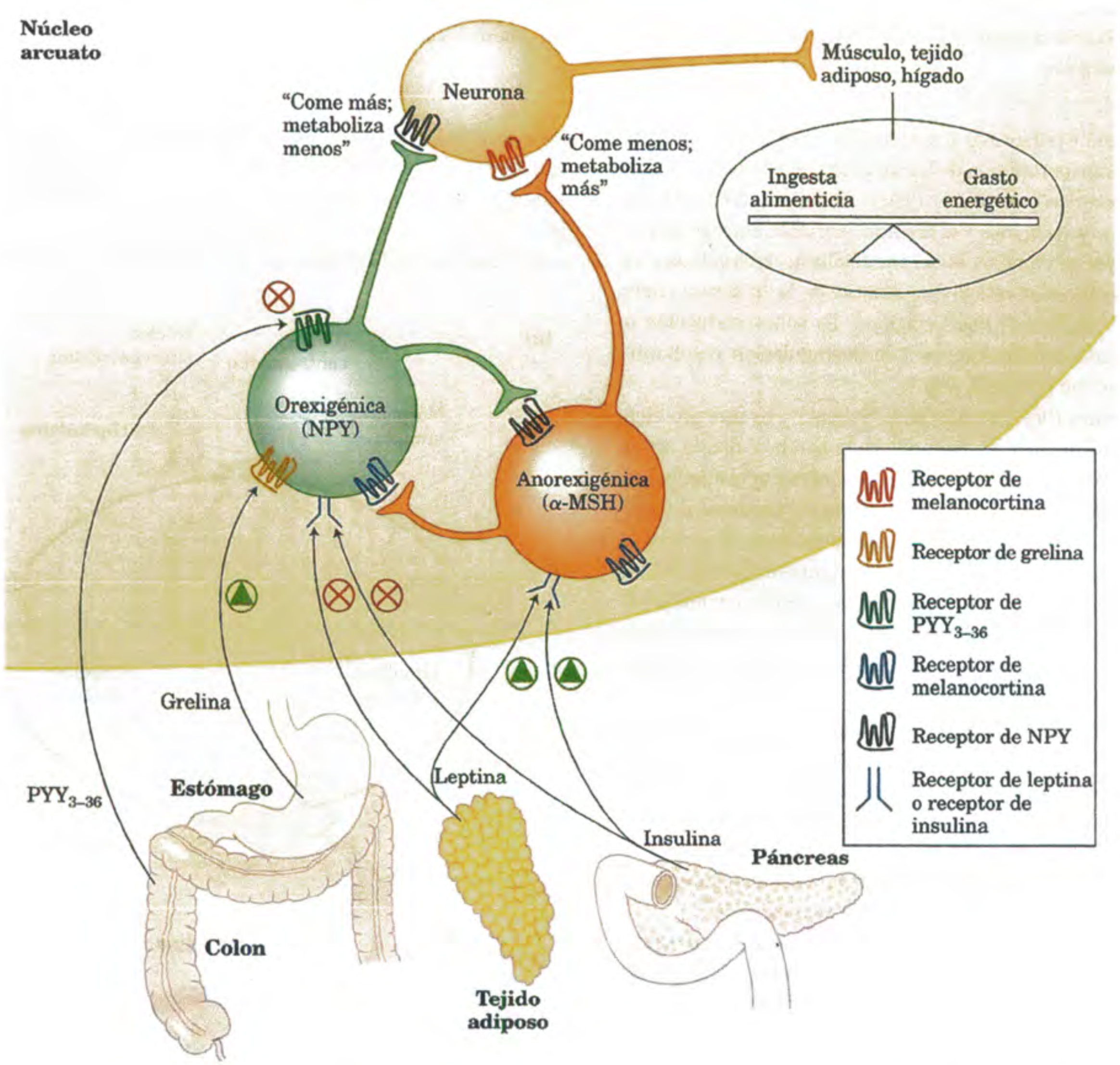


FIGURA 23–36 Hormonas que controlan la ingesta. En el núcleo arcuato, dos conjuntos de células neurosecretoras reciben información hormonal y transmiten señales neuronales a las células de los tejidos muscular, adiposo y hepático. La leptina y la insulina se liberan del tejido adiposo y del páncreas, respectivamente, proporcionalmente a la masa de grasa corporal. Las dos hormonas actúan sobre células neurosecretoras anorexigénicas para provocar la liberación de α-MSH (melanocortina); esto da lugar a señales neuronales para comer menos y metabolizar más combustible. La leptina y la insulina también actúan sobre células neurosecretoras orexigénicas para inhibir la liberación de NPY, reduciendo la señal "comer" enviada a los tejidos. Tal como se describe más adelante en el texto, la hormona gástrica grelina *estimula* el apetito por activación de las células que expresan NPY; PYY_{3-36}, liberado del colon, *inhibe* estas neuronas y de esta forma disminuye el apetito. Cada uno de los dos tipos de células neurosecretoras inhibe la producción hormonal por el otro tipo, de modo que cualquier estímulo que active las células orexigénicas inactiva las células anorexigénicas, y viceversa. Esto refuerza el efecto de las señales estimuladoras.

Las neuronas **anorexigénicas** (supresoras del apetito) del núcleo arcuato producen la **hormona estimuladora de los α-melanocitos (α-MSH;** también conocida como melanocortina), formada a partir del precursor polipeptídico proopiomelanocortina (POMC; Fig. 23–6). La liberación de α-MSH hace que la siguiente neurona del circuito envíe al cerebro la señal ¡Para de comer!

La cantidad de leptina liberada por el tejido adiposo depende tanto del número como del tamaño de los adipocitos. Cuando la pérdida de peso reduce la masa de tejido graso, bajan los niveles de leptina en sangre, lo mismo que la producción de NPY, y se invierten los procesos del tejido adiposo mostrados en la Figura 23–35. Disminuye el desacoplamiento, que enlentece la termogénesis, se ahorra combustible y la movilización de grasas es también más lenta en respuesta a una reducción en la señalización por cAMP. El consumo de más alimento combinado con una utilización más eficiente del combustible da lugar a una recuperación de la grasa de reserva en el tejido adiposo, que devuelve el sistema al equilibrio.

La leptina puede ser también esencial para el normal desarrollo de los circuitos neuronales del hipotálamo. En los ratones, el crecimiento de las fibras nerviosas desde el núcleo arcuato durante el desarrollo cerebral temprano es más lento en ausencia de leptina; se ven afectadas tanto las señales orexigénicas como (en menor medida) las anorexigénicas emitidas por el hipotálamo.

Es posible que los niveles de leptina *durante el desarrollo* de estos circuitos determinen los detalles de las conexiones de este sistema de regulación.

La leptina desencadena una cascada de señalización que regula la expresión génica

La señal de la leptina se transduce mediante un mecanismo utilizado también por los receptores del interferón y por los factores de crecimiento, denominado sistema JAK-STAT (**Fig. 23–37**; véase la Fig. 12–18).

El receptor de la leptina, que tiene un solo segmento transmembrana, dimeriza cuando la leptina se une a los dominios extracelulares de dos monómeros. Ambos monómeros son fosforilados en un residuo de Tyr del dominio intracelular por una **Janus quinasa (JAK).** Los residuos Ⓟ–Tyr se convierten en los sitios de unión de tres proteínas de transducción de señales y activadoras de la transcripción (**STAT** 3, 5 y 6, a veces denominados fat-STAT). Una vez unidos, los STAT son fosforilados en residuos de Tyr por la misma JAK. Después de la fosforilación, los STAT dimerizan y a continuación se trasladan al núcleo, donde se unen a secuencias específicas de DNA y estimulan la expresión de genes diana, entre ellos el gen de la POMC, a partir del cual se obtiene la α-MSH.

El aumento del catabolismo y la termogénesis desencadenados por la leptina se debe, en parte, al aumento de la síntesis de la proteína mitocondrial desacopladora (producto del gen *UCP1*) termogenina en los adipocitos. La leptina estimula la síntesis de termogenina, alterando la transmisión sináptica de las neuronas del núcleo arcuato al tejido adiposo y a otros tejidos. En estos tejidos la leptina provoca la liberación de noradrenalina, que actúa a través de los receptores β_3-adrenérgicos para estimular la transcripción del gen *UCP1*. El desacoplamiento resultante entre la transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa consume grasa y es termogénico (Fig. 23–35).

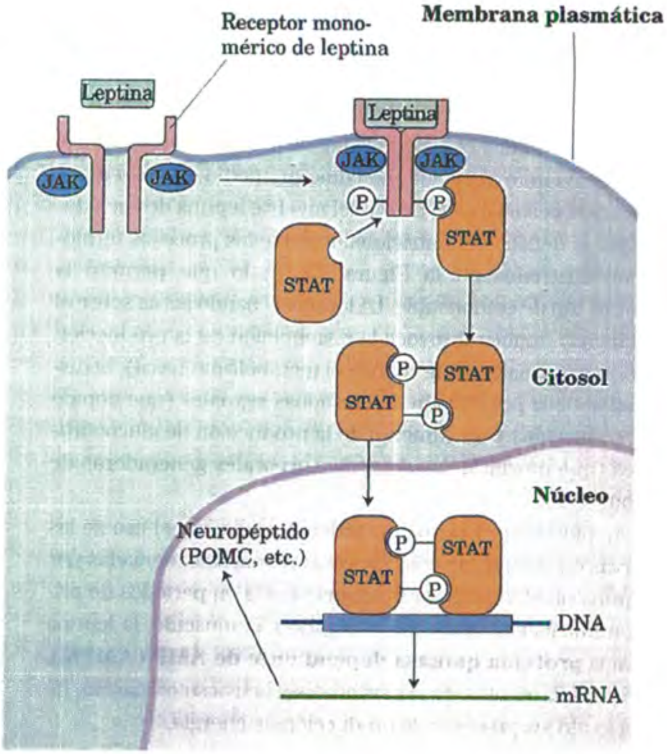


FIGURA 23–37 Mecanismo JAK-STAT de transducción de la señal de la leptina en el hipotálamo. La unión de la leptina induce la dimerización del receptor de leptina, que es seguida por la fosforilación de residuos Tyr del receptor, catalizada por la Janus quinasa (JAK). Las STAT, que se unen al receptor fosforilado de leptina a través de sus dominios SH2, se fosforilan a continuación en residuos Tyr por una actividad separada de JAK. Las STAT dimerizan por interacción recíproca con los residuos de Ⓟ–Tyr y entran en el núcleo, donde se unen a secuencias reguladoras específicas del DNA y modifican la expresión de ciertos genes. Finalmente, los productos de estos genes influyen en el comportamiento alimenticio y en el gasto energético del organismo.

¿Podría ser la obesidad humana consecuencia de una insuficiente producción de leptina y, por tanto, ser tratable por inyección de leptina? Los niveles sanguíneos de leptina son de hecho mucho *más altos* en animales obesos (incluidos los humanos) que en los animales de masa corporal normal (excepto, claro está, en los animales *ob/ob*, que no pueden producir leptina). Algún elemento en el sistema de respuesta de la leptina debe ser defectuoso en los individuos obesos y el aumento de leptina es el resultado de un intento (fallido) de superar la resistencia a la leptina.

En casos excepcionales de extrema obesidad en humanos, en los que se ha encontrado que un gen de la leptina era defectuoso *(OB)*, la inyección de leptina ha tenido como resultado una notable pérdida de peso. Sin embargo, en la inmensa mayoría de individuos obesos, el gen *OB* está intacto. En pruebas clínicas, la inyección de leptina no tuvo el efecto de pérdida de peso observada en los ratones obesos *ob/ob*. Es evidente que en la mayor parte de casos de obesidad humana intervienen otros factores además de la leptina.

El sistema de la leptina puede haber evolucionado para regular la respuesta a la inanición

El sistema de la leptina probablemente haya evolucionado para ajustar la actividad y el metabolismo del animal durante los períodos de ayuno e inanición, no como un medio de prevenir el aumento de peso. La *reducción* del nivel de leptina desencadenada por la deficiencia nutricional invierte los procesos termogénicos ilustrados en la Figura 23–35, lo que permite la conservación de combustible. La leptina (cuando actúa sobre el hipotálamo) también provoca la disminución de la producción de hormona tiroidea (que reduce el metabolismo basal), la disminución de la producción de hormonas sexuales (que impide la reproducción) y un aumento de la producción de glucocorticoides (que movilizan las reservas corporales generadoras de combustible).

Al minimizar el gasto energético y maximizar el uso de las reservas endógenas de energía, estas respuestas mediadas por la leptina pueden permitir la supervivencia en períodos de privación nutricional grave. En el hígado y el músculo, la leptina activa la **proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK),** que inhibe la síntesis de ácidos grasos y activa su oxidación, favoreciendo los procesos de producción de energía.

La insulina actúa en el núcleo arcuato para regular la ingesta y la conservación de energía

La secreción de insulina refleja tanto el tamaño de las reservas de grasa (adiposidad) como el equilibrio energético momentáneo (nivel de glucosa en sangre). La insulina actúa sobre los receptores de insulina en el hipotálamo para inhibir el apetito (Fig. 23–36). Los receptores de insulina en las neuronas orexigénicas del núcleo arcuato *inhiben* la liberación de NPY, mientras que los receptores de insulina en las neuronas anorexigénicas *estimulan* la producción de α-MSH, disminuyendo de este modo la ingesta energética e incrementando la termogénesis. Mediante mecanismos discutidos en la Sección 23.3, la insulina también indica a los tejidos muscular, hepático y adiposo que aumenten la conversión de glucosa en acetil-CoA, material de partida para la síntesis de grasas.

La leptina hace que las células del hígado y del músculo sean más sensibles a la insulina. Una hipótesis para explicar este efecto sugiere una comunicación cruzada entre las proteínas tirosina quinasas activadas por leptina y las activadas por insulina **(Fig. 23–38)**; segundos mensajeros comunes a las dos rutas de señalización permiten que la leptina desencadene algunos de los procesos posteriores que son desencadenados por la insulina a través del sustrato-2 del receptor de insulina (IRS-2) y la fosfoinositol 3-quinasa (PI-3K) (Fig. 12–16).

La adiponectina actúa a través de AMPK para aumentar la respuesta a la insulina

La **adiponectina** es una hormona peptídica (224 aminoácidos) producida casi exclusivamente por el tejido adiposo. Se trata de una adipoquina que sensibiliza otros órganos frente a los efectos de la insulina, protege frente a la aterosclerosis e inhibe las respuestas inflamatorias (adhesión de monocitos, transformación de macrófagos y proliferación y migración de las células del músculo liso vascular). La adiponectina circula por la sangre y afecta el metabolismo de los ácidos grasos y de los glúcidos en el hígado y el músculo. Aumenta la captación de ácidos grasos de la sangre por los miocitos y la velocidad a la que experimentan la β-oxidación en el músculo. También bloquea la síntesis de ácidos grasos y la gluconeogénesis en los hepatocitos y estimula la captación y el catabolismo de la glucosa en el músculo y el hígado.

Estos efectos de la adiponectina son indirectos y no totalmente comprendidos, pero en muchos casos están claramente mediados por AMPK. La adiponectina provoca la fosforilación y la activación de la AMPK, actuando a través de su receptor en la membrana plasmática. Recuérdese (véase la Fig. 15–6) que la AMPK es activada por factores que indican la conveniencia de desplazar el metabolismo en detrimento de las biosíntesis y a favor de la producción de energía **(Fig. 23–39)**. Cuando está activada, la AMPK fosforila diversas proteínas diana críticas para el metabolismo de los lípidos y de los glúcidos con profundos efectos sobre el metabolismo del animal entero **(Fig. 23–40)**. Los receptores de adiponectina también están presentes en el cerebro; la hormona activa la AMPK en el hipotálamo, estimulando la ingesta y reduciendo el gasto energético.

Un enzima regulado por la AMPK en el hígado y en el tejido adiposo blanco es la acetil-CoA carboxilasa, que produce malonil-CoA, primer intermedio comprometido en la síntesis de ácidos grasos. El malonil-CoA es un inhibidor poderoso del enzima carnitina aciltransferasa I, que inicia el proceso de la β-oxidación, transportando ácidos grasos al interior de la mitocondria

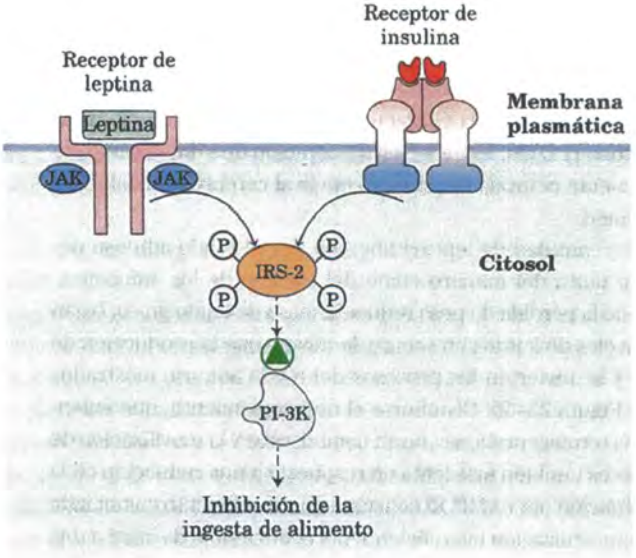


FIGURA 23–38 Un mecanismo posible de intercomunicación entre receptores de insulina y de leptina. El receptor de insulina tiene actividad Tyr quinasa intrínseca (véase la Fig. 12–15) y el receptor de leptina, cuando está ocupado por su ligando, se fosforila por una Tyr quinasa soluble (JAK). Una explicación posible para la interacción observada entre leptina e insulina es que las dos pueden fosforilar el mismo sustrato, en el caso aquí mostrado el sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2). Cuando está fosforilado, IRS-2 activa PI-3K, lo que tiene consecuencias posteriores, entre ellas la inhibición de la ingesta de alimentos. IRS-2 actúa aquí como integrador de la información procedente de dos receptores.

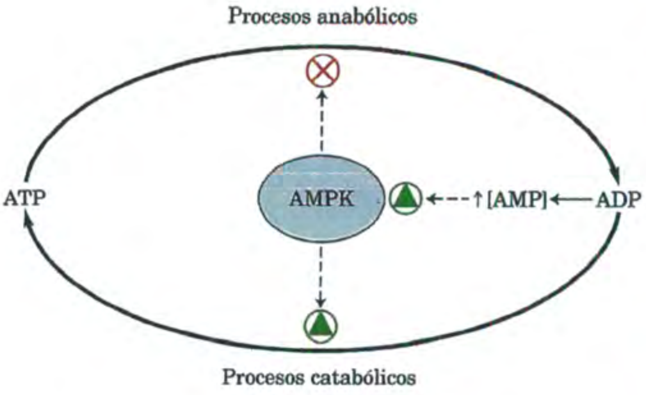


FIGURA 23–39 Papel de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en la regulación del metabolismo del ATP. El ADP producido en las reacciones de síntesis se convierte en AMP por la adenilato quinasa. El AMP activa la AMPK, que regula vías anabólicas y catabólicas fosforilando enzimas clave (véase la Fig. 23–40).

(véase la Fig. 17–6). Al fosforilar e inactivar la acetil-CoA carboxilasa, la AMPK inhibe la síntesis de ácidos grasos a la vez que alivia la inhibición (por malonil-CoA) de la β-oxidación (véase la Fig. 17–12). La síntesis de colesterol también es inhibida por la AMPK, que fosforila e inactiva la HMG-CoA reductasa, un enzima de la vía del colesterol (véase la Fig. 21–34). Del mismo modo, la AMPK inhibe la ácido graso sintasa y la acil transfersa, bloqueando de forma muy eficaz la síntesis de triacilgliceroles.

Los ratones con genes de adiponectina defectuosos son menos sensibles a la insulina que los que poseen adiponectina normal y muestran poca tolerancia a la glucosa: la ingestión de glúcidos en la dieta provoca un aumento duradero de la glucosa en sangre. Estos defectos metabólicos se parecen a los de los humanos con diabetes tipo 2, que son también **insensibles a la insulina** y eliminan lentamente la glucosa sanguínea. De hecho, los individuos con obesidad o diabetes tipo 2 tienen niveles de adiponectina en sangre inferiores a los de los

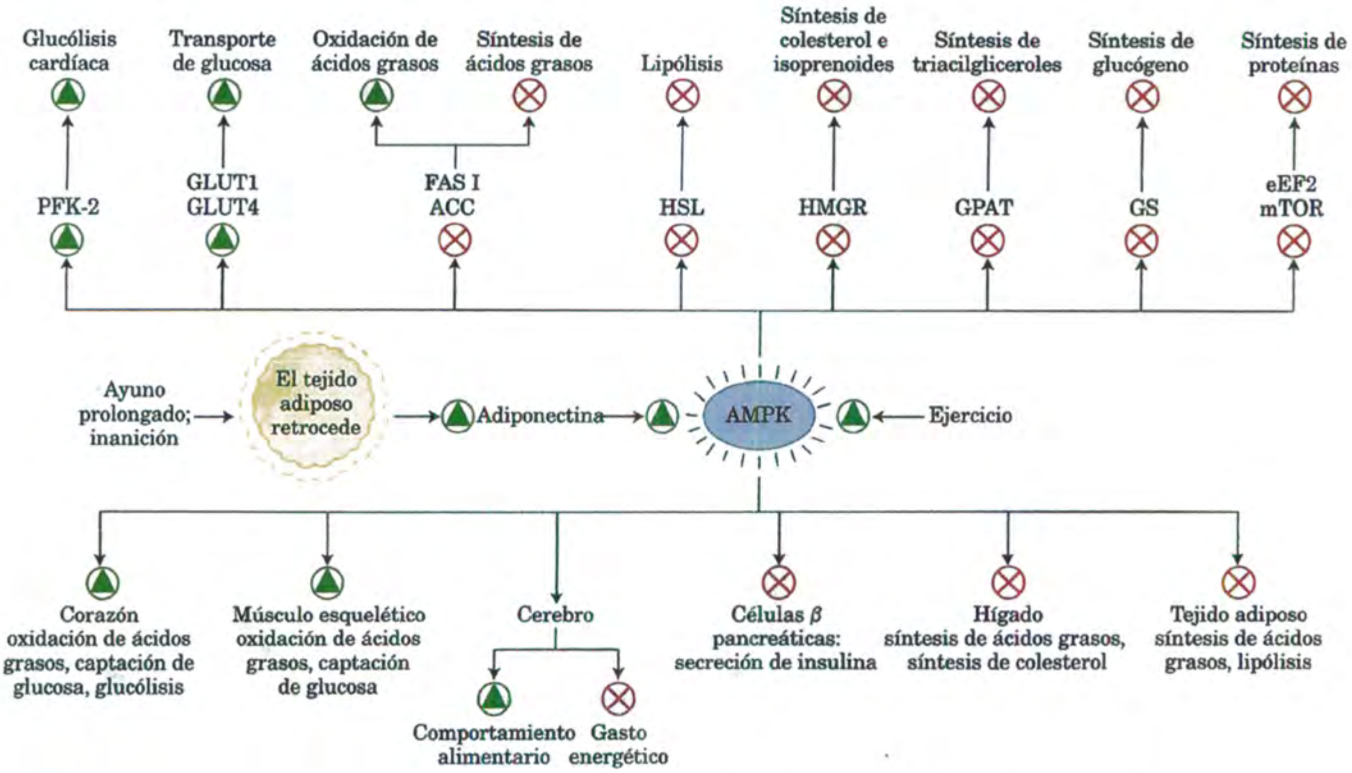


FIGURA 23–40 Formación de adiponectina y sus efectos a través de la AMPK. El ayuno prolongado o la inanición disminuyen las reservas de triacilgliceroles en el tejido adiposo, lo cual estimula la síntesis y liberación de adiponectina por los adipocitos. El aumento de la adiponectina plasmática actúa a través de sus receptores de la membrana plasmática sobre varios tipos celulares y órganos inhibiendo los procesos que consumen energía y estimulando aquellos que la producen. La adiponectina actúa a través de sus receptores en el cerebro, estimulando la ingesta e inhibiendo la actividad física que consume energía, así como inhibiendo la termogénesis en la grasa marrón. Esta hormona ejerce sus efectos metabólicos activando la AMPK, que regula (por fosforilación) enzimas específicos de procesos metabólicos clave (véase la Fig. 15–6). PFK-2, fosfofructoquinasa-2; GLUT1 y GLUT4, transportadores de glucosa; FAS I, ácido graso sintasa I; ACC, acetil-CoA carboxilasa; HSL, lipasa sensible a hormonas; HMGR, HMG-CoA reductasa; GPAT, acil transferasa; GS, glucógeno sintasa; eEF2, factor de elongación eucariótico 2 (necesario en la síntesis proteica; véase el Capítulo 27); mTOR, diana de la rapamicina de mamíferos (una proteína quinasa que regula la síntesis proteica según la disponibilidad de nutrientes). Los fármacos de tiazolidinodiona activan el factor de transcripción PPARγ (véanse las Figs. 23–41 y 23–42), que a su vez activan la síntesis de adiponectina activando indirectamente la AMPK. El ejercicio, a través de la conversión de ATP en ADP y AMP, también estimula la AMPK.

controles no diabéticos. Además, los medicamentos utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2 —las tiazolidinodionas, tales como la rosiglitazona (Avandia) y la pioglitazona (Actos) (p. 824)—, aumentan la expresión del mRNA de la adiponectina en el tejido adiposo y aumentan los niveles de adiponectina sanguínea en animales de experimentación; también activan la AMPK (Fig. 23–40). (En 2007 se tubo que examinar la seguridad de Avandia a causa de posibles riegos de ataque al corazón.) Parece probable que la adiponectina sea un vínculo importante entre la diabetes tipo 2 y el factor que más la favorece, la obesidad. ■

La dieta regula la expresión de genes cruciales para el mantenimiento de la masa corporal

Proteínas de una familia de factores de transcripción activados por ligando, los **receptores peroxisómicos activados por proliferador (PPAR),** responden a cambios en los lípidos de la dieta alterando la expresión de genes que intervienen en el metabolismo de grasas y glúcidos. Estos factores de transcripción se identificaron por primera vez por su función en la síntesis de peroxisomas; de ahí su nombre. Sus ligandos normales son ácidos grasos o derivados de ácidos grasos, pero también pueden unir agonistas sintéticos y pueden ser activados por manipulación genética en el laboratorio. Los PPARα, PPARδ y PPARγ son miembros de esta superfamilia de receptores nucleares. Actúan en el núcleo formando heterodímeros con otro receptor nuclear, el RXR (receptor X de retinoides), uniéndose a regiones reguladoras de DNA cerca de los genes bajo su control y cambiando su velocidad de transcripción **(Fig. 23–41)**.

PPARγ, expresado principalmente en el hígado y en el tejido adiposo, interviene en la activación de genes necesarios para la diferenciación de fibroblastos en adipocitos y genes que codifican proteínas requeridas en la síntesis y almacenamiento de lípidos en los adipocitos **(Fig. 23–42)**. El PPARγ es activado por fármacos de la clase de las tiazolidinadionas utilizadas en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

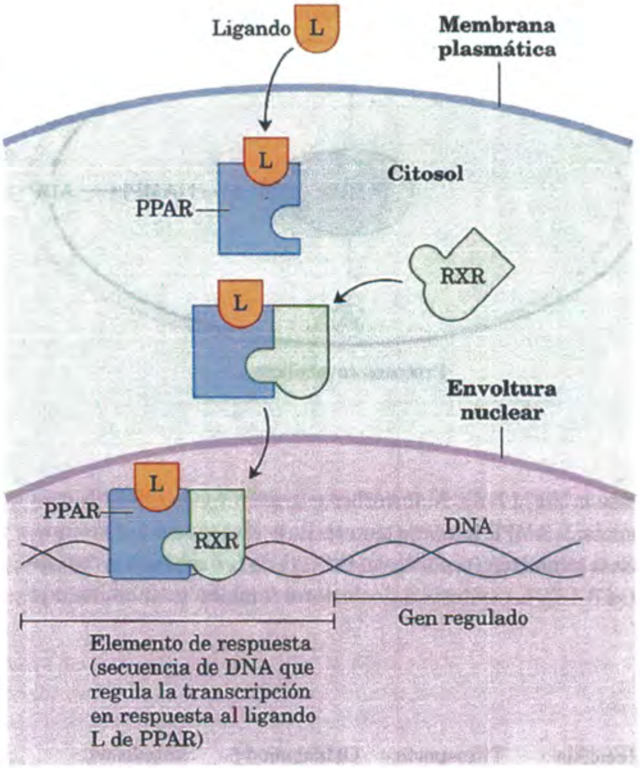


FIGURA 23–41 Modo de acción de los PPAR. Los PPAR son factores de transcripción que al unirse a su ligando específico (L) forman heterodímeros con el receptor nuclear RXR. El dímero se une a regiones específicas del DNA conocidas como elementos de respuesta, y de este modo estimula la transcripción de los genes de estas regiones.

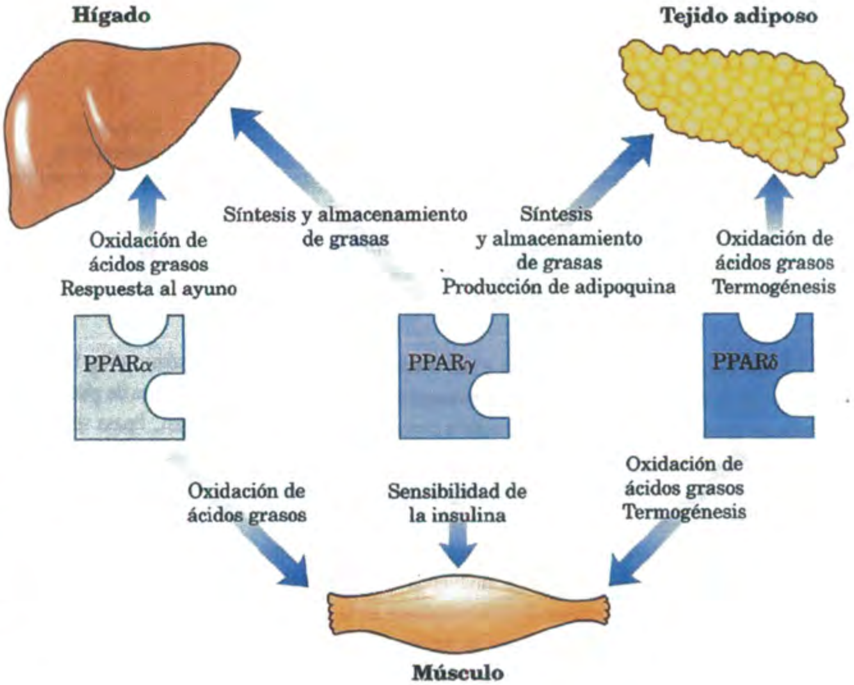


FIGURA 23–42 Integración metabólica por los PPAR. Las tres isoformas de los PPAR regulan la homeostasis de los lípidos y la glucosa mediante efectos coordinados sobre la expresión génica del hígado, el músculo y el tejido adiposo. PPARα y PPARδ (y su isoforma muy parecida PPARβ) regulan la utilización de los lípidos; PPARγ regula el almacenamiento de lípidos y la sensibilidad a la insulina en varios tejidos.

El **PPAR**α se expresa en el hígado, el riñón, el corazón, el músculo esquelético y el tejido adiposo marrón. Entre los ligandos que activan este factor de transcripción se encuentran los icosanoides, los ácidos grasos libres y los fármacos denominados fibratos, tales como el fenofibrato (TriCor) y el ciprofibrato (Modalim), que se usan para tratar las enfermedades coronarias, pues fomentan el aumento de las HDL y la disminución de los triacilgliceroles de la sangre. En los hepatocitos, el PPARα activa los genes necesarios para la β-oxidación de ácidos grasos y para la formación de cuerpos cetónicos durante el ayuno.

El **PPAR**δ (y su muy parecido isotipo, PPARβ) es un regulador clave de la oxidación de grasas que actúa en respuesta a los cambios en los lípidos de la dieta. Actúa en el hígado y en el músculo estimulando la transcripción de al menos nueve genes que codifican proteínas de la β-oxidación y para la disipación de energía a través del desacoplamiento de las mitocondrias. Ratones normales sobrealimentados con dietas ricas en grasas acumulan grandes cantidades tanto de grasa marrón como de grasa blanca, así como gotículas de grasa en el hígado. Cuando el mismo experimento de sobrealimentación se realiza con ratones que tienen PPARδ alterado genéticamente, de modo que siempre es activo, no se produce la acumulación de grasa. En ratones con receptores de leptina no funcionales (*db/db*), el PPARδ activado impide el desarrollo de la obesidad que se hubiese producido (véase la Fig. 23–34). Al estimular la degradación de ácidos grasos en mitocondrias desacopladas, el PPARδ provoca la disminución de las grasas, pérdida de peso y termogénesis. A la luz de todo esto, la termogénesis es tanto un medio para mantenerse caliente como una defensa contra la obesidad. Está claro que el PPARδ es una diana potencial de los medicamentos para el tratamiento de la obesidad.

La grelina y la PYY_{3-36} influyen en los hábitos de ingesta a corto plazo

La **grelina** es una hormona peptídica (28 aminoácidos) producida por células que revisten el estómago. Se identificó originalmente como el estímulo para la liberación de la hormona de crecimiento (*ghre* es una raíz protoindoeuropea que significa "crecimiento"), y se vio posteriormente que era un poderoso estimulante del apetito que actúa en una escala de tiempo más corta (entre comidas) que la leptina y la insulina. Los receptores de grelina están situados en la hipófisis (presumiblemente interviene en la liberación de la hormona del crecimiento) y en el hipotálamo (donde afecta al apetito), así como en el músculo cardíaco y en el tejido adiposo. La concentración de grelina en sangre varía de forma manifiesta entre comidas, con un máximo justo antes de una comida y un descenso abrupto justo después de la comida **(Fig. 23–43)**. La inyección de grelina produce sensaciones inmediatas de hambre intensa en humanos. Los individuos con el síndrome de Prader-Willi, cuyos niveles sanguíneos de grelina son excepcionalmente elevados, tienen un apetito incontrolable que provoca una obesidad extrema que frecuentemente lleva a la muerte antes de los 30 años de edad.

La **PYY_{3-36}** es una hormona peptídica (34 aminoácidos) secretada por células endocrinas del revestimiento del intestino delgado y del colon en respuesta a la entrada de alimento en el estómago. El nivel de PYY_{3-36} en sangre aumenta después de una comida y permanece elevada durante unas horas. Es transportada por la sangre hasta el núcleo arcuato donde actúa sobre las neuronas orexigénicas, inhibiendo la liberación de NPY y reduciendo el hambre (Fig. 23–36). Los humanos a los que se inyecta PYY_{3-36} tienen poco apetito y comen cantidades inferiores a las normales durante unas 12 horas.

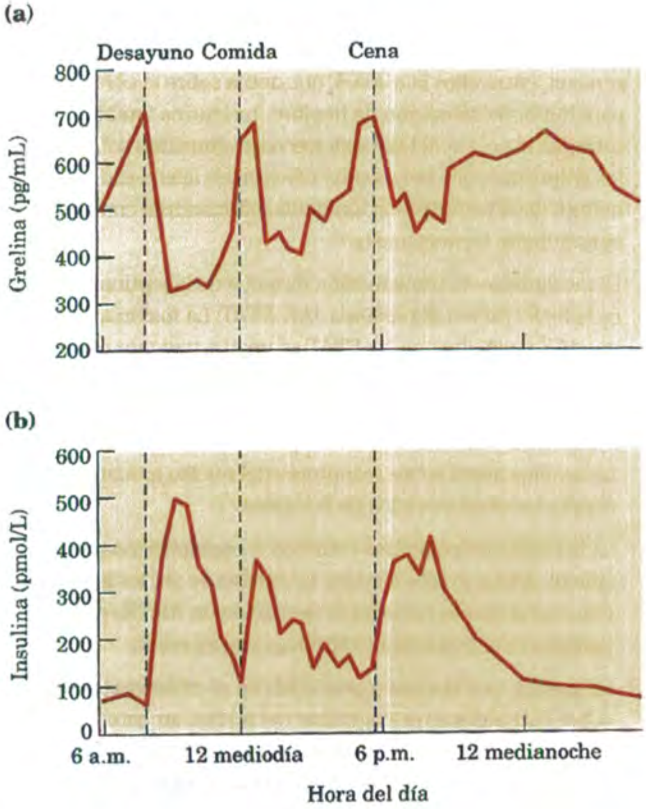


FIGURA 23–43 Variaciones de la grelina y la insulina en relación con los horarios de comida. **(a)** Los niveles plasmáticos de grelina aumentan abruptamente justo *antes* de la hora normal de las comidas (7 de la mañana para el desayuno, 12 del mediodía para la comida, 17,30 de la tarde para la cena) y caen rápidamente inmediatamente después de las comidas, en paralelo con la sensación subjetiva de hambre. **(b)** Los niveles de insulina aumentan inmediatamente *después* de cada comida, como respuesta al incremento en la concentración de glucosa en sangre.

Este sistema interconectado de controles neuroendocrinos sobre la ingesta de alimento y el metabolismo probablemente haya evolucionado para proteger contra la inanición y eliminar la acumulación de grasa (obesidad extrema). La dificultad experimentada por muchas personas cuando intentan perder peso es testimonio de la notable efectividad de estos controles.

RESUMEN 23.4 Obesidad y regulación de la masa corporal

- La obesidad es cada vez más frecuente en los países desarrollados y predispone a las personas a estados peligrosos para la vida.
- El tejido adiposo produce la leptina, una hormona que regula la alimentación y el gasto energético para mantener reservas de grasa. La producción y la liberación de leptina aumenta con el número y el tamaño de los adipocitos.

- La leptina actúa sobre receptores del núcleo arcuato del hipotálamo y provoca la liberación de péptidos anorexigénicos, entre ellos la α-MSH, que actúa sobre el cerebro para inhibir la sensación de hambre. La leptina también estimula la acción del sistema nervioso simpático sobre los adipocitos, que tiene como consecuencia el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial con la consiguiente termogénesis.
- El mecanismo de transducción de señal de la leptina implica la fosforilación del sistema JAK-STAT. La fosforilación por JAK posibilita que los STAT se unan a regiones reguladoras del DNA nuclear, alterando la expresión de genes que codifican proteínas que marcan el nivel de actividad metabólica y determinan el comportamiento alimenticio. La insulina actúa sobre receptores del núcleo arcuato con resultados similares a los de la leptina.
- La hormona adiponectina estimula la captación y oxidación de ácidos grasos e inhibe la síntesis de ácidos grasos. Para sus acciones necesita la mediación de AMPK, que también es activada por [AMP] baja y el ejercicio.
- La grelina, una hormona producida en el estómago, actúa sobre las neuronas orexigénicas del núcleo arcuato para producir hambre antes de una comida. La PYY_{3-36}, una hormona peptídica del intestino, actúa en el mismo sitio reduciendo el apetito después de una comida.

23.5 Obesidad, síndrome metabólico y diabetes de tipo 2

En el mundo industrializado, donde la disponibilidad de alimentos es más que adecuada, existe una epidemia creciente de la obesidad y de la diabetes tipo 2 a ella asociada. En el mundo hay entre 150 y 170 millones de personas con diabetes, principalmente de tipo 2. El número calculado de casos para el 2010 es de 220 millones, y de 360 millones para el 2030. La patología de la diabetes incluye enfermedades cardiovasculares, fallo renal, ceguera, amputaciones debidas a la mala cicatrización en las extremidades y neuropatía. En el 2000, la mortalidad debida a la diabetes fue de 2,9 millones, cifra que con toda seguridad aumentará en los próximos años. Es evidente que es necesario comprender la diabetes de tipo 2 y su relación con la obesidad y encontrar contramedidas que prevengan o reviertan el daño causado por esta enfermedad. ■

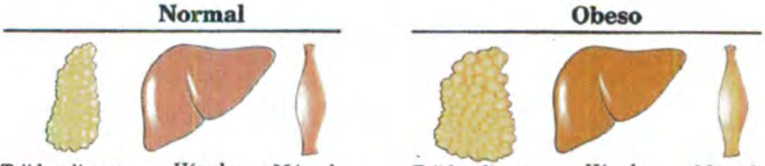
En la diabetes de tipo 2 los tejidos se vuelven insensibles a la insulina

El rasgo más genuino de la diabetes de tipo 2 es el desarrollo de resistencia a la insulina: estado en el que se necesita más insulina para conseguir los mismos efectos biológicos producidos por una menor cantidad de insulina en el estado de salud normal. En las primeras etapas de la enfermedad, las células β pancreáticas segregan suficiente insulina para compensar la menor sensibilidad a la insulina del músculo y el hígado. Pero las células β finalmente sucumben y la falta de insulina se manifiesta por la incapacidad del organismo para regular la glucosa en sangre. El estadio intermedio, previo a la diabetes mellitus tipo 2, a veces se denomina **síndrome metabólico** o **síndrome X.** Éste se caracteriza por obesidad, especialmente en el abdomen; hipertensión (alta presión sanguínea); lípidos sanguíneos anormales (TAG y LDL altos, HDL bajas); glucosa en sangre ligeramente elevada, y una capacidad disminuida para eliminar la glucosa en un test de tolerancia a la glucosa. Los individuos con síndrome metabólico a menudo también muestran cambios en las proteínas sanguíneas, cambios que están asociados con la coagulación anormal (elevada concentración de fibrinógeno) o la inflamación (elevada concentración de péptido C reactivo, que aumenta de modo característico en la respuesta inflamatoria). ¡Alrededor del 27% de la población adulta de Estados Unidos presenta estos síntomas del síndrome metabólico!

De acuerdo con la hipótesis de la "carga lipídica" para explicar la aparición de la diabetes de tipo 2, la acción de la PPARγ sobre los adipocitos los mantiene en disposición de sintetizar y almacenar triacilgliceroles, los adipocitos son sensibles a la insulina y producen leptina, que provoca el almacenamiento intracelular continuado de TAG. Sin embargo, en los individuos obesos los adipocitos están rellenos de TAG y el tejido adiposo no puede afrontar aumentos ulteriores de la demanda de almacenamiento de TAG. Los adipocitos y sus precursores, los preadipocitos, se vuelven menos sensibles a la insulina. La expresión génica asociada normalmente con el desarrollo de nuevos adipocitos (los genes para los factores de transcripción SREBP1 y PPARγ, por ejemplo) *disminuye* en los adipocitos de los individuos obesos, pero *aumenta* en otros tejidos, como el músculo esquelético y el hígado, que empiezan a almacenar TAG (**Fig. 23–44**). Importantes cantidades de triacilgliceroles se almacenan "ectópicamente", es decir, en lugares anormales. Además, según esta hipótesis el exceso de ácidos grasos y TAG almacenados son tóxicos para el hígado y el músculo. Algunos individuos están menos dotados genéticamente para afrontar semejante carga de lípidos ectópicos y son más susceptibles al daño celular que conduce al desarrollo de la diabetes de tipo 2. La resistencia a la insulina probablemente implica el deterioro de varios de los mecanismos a través de los cuales la insulina ejerce sus efectos metabólicos: cambios en los niveles de proteínas, cambios en las actividades de enzimas de señalización y de factores de transcripción. Por ejemplo, tanto la síntesis de adiponectina en los adipocitos como la adiponectina en sangre disminuyen con la obesidad y aumentan con la pérdida de peso.

La inflamación crónica del tejido adiposo es común en la obesidad. Los genes asociados a la inflamación y los macrófagos están activados y la invasión del tejido adiposo por macrófagos se observa con frecuencia en individuos obesos. Los adipocitos sobrecargados de lípidos también sufren lipoapoptosis, muerte celular programada desencadenada por concentraciones anormales de lípidos.

Varios fármacos que aumentan la sensibilidad a la insulina en la diabetes de tipo 2 actúan sobre proteínas específicas de las rutas de señalización y su acción está de acuerdo con el modelo de la lipotoxicidad. Las tiazolidinodionas se unen al PPARγ, activando una serie de genes específicos de los adipocitos que promueven la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos pequeños, y de este modo aumentan la capacidad del organismo



	Normal: Tejido adiposo	Normal: Hígado	Normal: Músculo	Obeso: Tejido adiposo	Obeso: Hígado	Obeso: Músculo
Expresión de PPARγ	+++	+	+/–	+	+++	+++
Expresión de SREBP1	+++	+	+/–	+/–	+++	+++
Capacidad de síntesis de lípidos, almacenamiento	+++	+/–	+/–	+/–	+++	+++
Sensibilidad de la insulina	+++	+++	+++	+	+	+

FIGURA 23–44 Hipótesis de la "carga lipídica" para el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. Normalmente, los adipocitos disponen de capacidad de reserva para almacenar triacilgliceroles, garantizada por la expresión del factor de transcripción PPARγ. En la obesidad, la capacidad del tejido adiposo para almacenar triacilgliceroles está agotada. La actividad de la maquinaria de síntesis de lípidos mantenida por SREBP1 disminuye a medida que la expresión de este factor de transcripción disminuye en los adipocitos y aumenta en el hígado y el músculo y estos tejidos empiezan a almacenar TAG. El almacenamiento ectópico de lípidos se tolera mejor en unos individuos que en otros; los más tolerantes son genéticamente menos susceptibles a los efectos deletéreos del almacenamiento ectópico de lípidos (que conduce a la diabetes tipo 2) o están genéticamente mejor equipados para manejar este almacenamiento.

para absorber ácidos grasos de la dieta y almacenarlos como TAG.

Hay factores genéticos que claramente predisponen a la diabetes de tipo 2. Aunque el 80% de diabéticos de tipo 2 son obesos, la mayoría de individuos obesos no desarrollan diabetes de tipo 2. Dada la complejidad de los mecanismos de regulación descritos en este capítulo, no es sorprendente que la genética de la diabetes sea compleja y que incluya interacciones entre genes variables y factores ambientales, entre los que se cuentan la dieta y el estilo de vida. Al menos 10 loci genéticos han sido asociados con seguridad con la diabetes de tipo 2; los cambios en uno solo de cualquiera de estos "diabetogenes" producirían un aumento relativamente pequeño de la probabilidad de desarrollar diabetes de tipo 2. Por ejemplo, los individuos con una variante del PPARγ en la cual un residuo de Ala sustituye a la Pro en posición 12 muestran un pequeño pero significativo aumento del riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2. ■

La diabetes de tipo 2 se trata con dieta, ejercicio y medicación

Diversos estudios muestran que tres factores mejoran la salud de los individuos con diabetes de tipo 2: dieta restringida, ejercicio regular y fármacos que aumenten la sensibilidad a la insulina o su producción. La dieta restringida (y la consiguiente pérdida de peso) reduce la carga general del manejo de los ácidos grasos. La composición lipídica de la dieta influye a través de los PPAR y otros factores de transcripción en la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos y en el consumo energético por termogénesis. El ejercicio activa la AMPK, al igual que la adiponectina; el AMPK desplaza el metabolismo hacia la oxidación de las grasas e inhibe la síntesis de las mismas.

En el tratamiento de la diabetes de tipo 2 se utilizan varias clases de fármacos, algunos de los cuales ya hemos discutido en

TABLA 23–7 Tratamientos de la diabetes mellitus tipo 2

Intervención/tratamiento	Diana directa	Efecto del tratamiento
Pérdida de peso	Tejido adiposo; reduce el contenido de TAG	Reduce la carga lipídica; aumenta la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo; restablece la sensibilidad a la insulina
Ejercicio	Activación de la AMPK por aumento de [AMP]/[ATP]	Véase la Fig. 23–40; ayuda a la pérdida de peso
Sulfonilureas: glipizida (Glucotrol), gliburida (varias marcas), glimepirida (Amaryl)	Células β pancreáticas; bloqueo de los canales de K^+	Estimula la secreción de insulina por el páncreas
Biguanidas: metformina (Glucophage)	Activación de la AMPK	Aumenta la asimilación de glucosa por el músculo; disminuye su producción en el hígado
Tiazoladinodionas: troglitazona (Rezulin),* rosiglitazona (Avandia),† pioglitazona (Actos)	PPARγ	Estimula la expresión de algunos genes, potenciando la acción de la insulina en el hígado, músculo, y tejido adiposo; aumenta la asimilación de la glucosa; disminuye la síntesis de glucosa en el hígado
Moduladores del GLP-1: exenatida (Byetta), sitagliptina (Januvia)	Péptido-1 tipo glucagón, dipéptido proteasa IV	Aumenta la secreción de insulina por el páncreas

*Retirado voluntariamente debido a efectos secundarios.

†En situación de reevaluación debido a que están apareciendo efectos secundarios.

este capítulo (Tabla 23–7). Las biguanidas tales como metformin (Glucophage) activan el AMPK, simulando los efectos de la adiponectina. Las tiazolidinodionas actúan a través de los PPAR para aumentar la concentración de adiponectina en el plasma y estimular la diferenciación de los adipocitos, y así aumentar la capacidad de almacenamiento de TAG. Las sulfonilureas actúan sobre los canales de K^+ controlados por ATP de las células β para estimular la liberación de insulina. Los inhibidores de la dipéptido proteasa IV (DPP IV) impiden la degradación proteolítica del péptido-1 análogo del glucagón (GLP-1), una hormona peptídica producida en el intestino que estimula la secreción pancreática de insulina. La inhibición de la peptidasa prolonga la acción de GLP-1, que redunda en un incremento efectivo de la secreción de insulina.

Claramente, una combinación de pérdida de peso y ejercicio es la mejor forma de *prevenir* el síndrome metabólico y la diabetes de tipo 2. Resultados recientes sugieren una interesante posibilidad para favorecer la pérdida de peso y reducir la cantidad de TAG que tienen que almacenarse. La proteína PRDM16 se expresa intensamente y tal vez exclusivamente en el tejido adiposo marrón. Su función exacta es desconocida, pero posee un dedo de zinc, característico de muchas proteínas que interaccionan con el DNA y afectan a la transcripción (véase la Fig. 28–12). Cuando se sobreexpresa en el tejido adiposo de ratones, la PRDM16 induce la diferenciación de los preadipocitos del tejido adiposo blanco en adipocitos *marrones* con elevados niveles de termogenina y respiración notablemente desacoplada. Estas células podrían, en principio, consumir ácidos grasos por encima de la cantidad necesaria para la producción de ATP, convirtiendo la energía de la oxidación en calor. Dada la difusión y el aumento de la incidencia de la diabetes de tipo 2, la investigación de formas para impedir o revertir la enfermedad atraerá sin lugar a dudas mucho interés. ■

RESUMEN 23.5 Obesidad, síndrome metabólico y diabetes de tipo 2

- El síndrome metabólico, que incluye la obesidad, hipertensión, lípidos sanguíneos elevados y resistencia a la insulina, es a menudo el preludio de la diabetes de tipo 2.
- La resistencia a la insulina que caracteriza la diabetes de tipo 2 puede ser consecuencia del almacenamiento anormal de lípidos en el músculo y en el hígado en respuesta a una ingesta de lípidos que no puede ser acomodada por el tejido adiposo.
- La expresión de los enzimas de la síntesis de lípidos se encuentra sometida a una regulación bastante estricta y compleja. Los PPAR son factores de transcripción que determinan la velocidad de síntesis de muchos enzimas implicados en el metabolismo lipídico y en la diferenciación de los adipocitos.
- Entre los tratamientos eficaces de la diabetes de tipo 2 se cuentan el ejercicio, la dieta apropiada y los fármacos que aumentan la sensibilidad a la insulina o la producción de insulina.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

sistema neuroendocrino 901
radioinmunoensayo (RIA) 902
análisis de Scatchard 905
endocrino 906
paracrino 906
autocrino 906
insulina 906
adrenalina 907
noradrenalina 907
catecolaminas 907
hormonas icosanoides 907
hormonas esteroideas 908
hormona de la vitamina D 908
hormonas retinoides 908
hormonas tiroideas 909
óxido nítrico (NO) 909
NO sintasa 909
hipotálamo 909
hipófisis posterior 909
hipófisis anterior 909
hormona trópica 909
tropinas 909
hepatocito 913
tejido adiposo blanco (WAT) 916
adipocito 916
tejido adiposo marrón (BAT) 917
termogenina (proteína desacoplante) 917
termogénesis 917
miocito 918
eritrocito 921
leucocito 921
linfocito 921
plaquetas 921
plasma sanguíneo 921
proteínas plasmáticas 921
canales de K^+ regulados por ATP 924
glucagón 925
cortisol 929
diabetes mellitus 929
diabetes tipo 1 929
diabetes tipo 2 929
glucosuria 929
cetosis 929
acidosis 930
cetoacidosis 930
prueba de tolerancia a la glucosa 930
obesidad 930
adipoquinas 930
leptina 931
receptor de leptina 931
orexigénico 932
neuropéptido Y (NPY) 932
anorexigénico 933
hormona estimuladora de los α-melanocitos (α-MSH) 933
Janus quinasa (JAK) 933
STAT (transductor de señal y activador de la transcripción) 933
proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) 934
adiponectina 934
PPAR (receptor peroxisómico activado por proliferador) 936
grelina 937
PYY_{3-36} 937
síndrome metabólico 938

Bibliografía

Panorama general

Chew, S.L. & Leslie, D. (2006) *Clinical Endocrinology and Diabetes: An Illustrated Colour Text*, Churchill Livingstone, Edinburgh.

Litwack, G. & Schmidt, T.J. (2006) Biochemistry of hormones. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 6th edn (Devlin, T.M., ed.), pp. 891–948, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Melmed, S. & Conn, P.M. (eds). (2005) *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*, 2nd edn, Humana Press, Totowa, NJ.

Yalow, R.S. (1978) Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. *Science* **200**, 1236–1245.

Historia del desarrollo del radioinmunoensayo; se trata de la conferencia de aceptación del premio Nobel por el autor.

Metabolismo específico de los tejidos

Avram, A.S., Avram, M.M., & James, W.D. (2005) Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**, 671–683.

Cannon, B. & Nedergaard, K. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359.

Elia, M. (1995) General integration and regulation of metabolism at the organ level. *Proc. Nutr. Soc.* **54**, 213–234.

Randle, P.J. (1995) Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level. *Proc. Nutr. Soc.* **54**, 317–327.

Regulación hormonal y metabolismo energético

Ashcroft, F.M. (2005) ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J. Clin. Invest.* **115**, 2047–2058.

Attie, A.D. & Raines, R.T. (1995) Analysis of receptor-ligand interactions. *J. Chem. Educ.* **72**, 119–123.

Cahill, G.F., Jr. (2006) Fuel metabolism in starvation. *Annu. Rev. Nutr.* **26**, 1–22.

Desvergne, B., Michalik, L., & Wahli, W. (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.

Feige, J.N. & Auwerx, J. (2007) Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol.* **17**, 292–301.

Hardie, D.G. & Sakamoto, K. (2006) AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology* **21**, 48–60.

Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., & Tobe, K. (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **116**, 1784–1792.

Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G.A., Grossman, A.B., & Korbonits, M. (2006) Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 205–215.

Kraemer, D.K., Al-Khalili, L., Guigas, B., Leng, Y., Garcia-Roves, P.M., & Krook, A. (2007) Role of AMP kinase and PPARδ in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **282**, 19,313–19,320.

Nichols, C.G. (2006) K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**, 470–476.

Steinberg, G.R. & Kemp, B.E. (2007) Adiponectin: starving for attention. *Cell Metab.* **6**, 3–4.

Control de la masa corporal

Ahima, R.S. (2005) Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 307–313.

La disminución de la leptina es una señal importante para conmutar entre los estados nutrido y de ayuno.

Ahima, R.S. (2006) Ghrelin—a new player in glucose homeostasis? *Cell Metab.* **3**, 301–307.

Biddinger, S.B. & Kahn, C.R. (2006) From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 123–158.

Revisión de la estructura, función y papel de las proteínas desacopladoras.

Friedman, J.M. (2002) The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr. Rev.* **60**, S1–S14.

Revisión de nivel medio de todos los aspectos del sistema de la biología de la leptina.

Jequier, E. & Tappy, L. (1999) Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* **79**, 451–480.

Revisión detallada del papel de la leptina en la regulación del peso corporal, el control de la ingestión de alimentos y los papeles de los tejidos adiposos blanco y marrón en el gasto energético.

Marx, J. (2003) Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science* **299**, 846–849.

Revisión breve de la bioquímica del control de peso, e introducción a varios artículos del mismo número de *Science* sobre la obesidad en el hombre.

Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., & Schwartz, M.W. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**, 289–295.

Smith, R.G., Jiang, H., & Sun, Y. (2005) Developments in ghrelin biology and potential clinical relevance. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 436–442.

Wieçek, A., Adamczak, M., & Chudek, J. (2007) Adiponectin—an adipokine with unique metabolic properties. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22**, 981–988.

Obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2

Barish, G.D., Narkar, V.A., & Evans, R.M. (2006) PPARδ: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **116**, 590–597.

Clee, S.M. & Attie, A.D. (2007) The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocrinol. Rev.* **28**, 48–83.

Hofbauer, K.G., Nicholson, J.R., & Boss, O. (2007) The obesity epidemic: current and future pharmacological treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 565–592.

Kasuga, M. (2006) Insulin resistance and pancreatic β cell failure. *J. Clin. Invest.* **116**, 1756–1760.

Introducción a una serie de revisiones sobre la diabetes tipo 2 en este ejemplar de la revista.

Klein, J., Perwitz, N., Kraus, D., & Fasshauer, M. (2006) Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 26–32.

Revisión de nivel intermedio.

Muoio, D.M. & Newgard, C.B. (2006) Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 367–401.

Nadler, S.T. & Attie, A.D. (2001) Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J. Nutr.* **131**, 2078–2081.

Clara descripción de la hipótesis de la "carga lipídica" para el origen de la diabetes de tipo 2.

Powell, K. (2007) The two faces of fat. *Nature* **447**, 525–527.

Señales de las células adiposas provocan directamente resistencia a la insulina y desencadenan inflamación, que a su vez causa diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, aumento del riesgo de cáncer y otros problemas asociados a la obesidad.

Qatanani, M. & Lazar, M.A. (2007) Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* **21**, 1443–1455.

Savage, D.B., Petersen, K.F., & Shulman, G.I. (2007) Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol. Rev.* **87**, 507–520.

Saxena, R., Voight, B.F., Lyssenko, V., Burtt, N.P., de Bakker, P.I.W., Chen, H., Roix, J.J., Kathiresan, S., Hirschhorn, J.N., Daly, M.J., et al. (2007) Genome-wide associations analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* **316**, 1331–1336.

Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., & Spiegelman, B.M. (2007) Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* **6**, 38–54.

La sobreexpresión de PRDM16 causa el desarrollo del tejido adiposo marrón.

Semple, R.K., Chatterjee, V.K.K., & O'Rahilly, S. (2006) PPARγ and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 581–589.

Sharma, A.M. & Staels, B. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipose tissue—understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 386–395.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., & Chen, H. (2003)

Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830.

Problemas

1. Actividad de hormonas peptídicas Explique cómo dos hormonas peptídicas tan parecidas estructuralmente tales como la oxitocina y la vasopresina pueden tener efectos tan diferentes (véase la Fig. 23–10).

2. ATP y fosfocreatina como fuentes de energía para el músculo Durante la contracción muscular, la concentración de fosfocreatina en el músculo esquelético cae mientras la concentración de ATP se mantiene bastante constante. Sin embargo, Robert Davies halló en un experimento clásico que si el músculo era previamente tratado con 1-flúor-2,4-dinitrobenceno (p. 94), la concentración de ATP disminuía rápidamente, mientras que la concentración de fosfocreatina permanecía inalterada durante una serie de contracciones. Sugiera una explicación.

3. Metabolismo del glutamato en el cerebro El tejido cerebral capta el glutamato de la sangre y lo transforma en glutamina que libera a la sangre. ¿Qué se consigue con esta transformación metabólica? ¿Cómo se produce? De hecho, el cerebro puede generar más glutamina de la que se puede fabricar a partir del glutamato que llega de la sangre. ¿Cómo se forma esta glutamina extra? (Pista: puede ser útil revisar el catabolismo de los aminoácidos en el Capítulo 18; recuerde que el NH_4^+ es muy tóxico para el cerebro.)

4. Las proteínas como combustible durante el ayuno Cuando las proteínas musculares son catabolizadas durante el ayuno en el músculo esquelético ¿cuál es el destino de los aminoácidos?

5. Ausencia de glicerol quinasa en el tejido adiposo El glicerol 3-fosfato es necesario para la biosíntesis de los triacilgliceroles. Los adipocitos, que están especializados en la síntesis y degradación de triacilgliceroles, no pueden utilizar directamente el glicerol, puesto que carecen de glicerol quinasa, que cataliza la reacción

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \longrightarrow \text{glicerol 3-fosfato} + \text{ADP}$$

¿Cómo consigue el tejido adiposo el glicerol 3-fosfato necesario para la síntesis de triacilgliceroles?

6. Consumo de oxígeno durante el ejercicio Un adulto sedentario consume alrededor de 0,05 L de O_2 en 10 segundos. Un deportista en una carrera de 100 m lisos consume alrededor de 1 L de O_2 en el mismo tiempo. Una vez acabada la carrera, el deportista sigue respirando a un ritmo gradualmente menos intenso durante unos minutos, consumiendo unos 4 L de O_2 más que el individuo sedentario.

(a) ¿Por qué las necesidades de O_2 aumentan drásticamente durante la carrera?

(b) ¿Por qué la demanda de O_2 se mantiene elevada una vez finalizada la carrera?

7. Carencia de tiamina y funciones cerebrales Los individuos con deficiencia de tiamina muestran una serie de manifestaciones neurológicas características: pérdida de reflejos, ansiedad y confusión mental. Sugiera una explicación de por qué la deficiencia de tiamina se manifiesta con alteraciones de la función cerebral.

8. Potencia hormonal En condiciones normales, la médula suprarrenal humana secreta adrenalina ($C_9H_{13}NO_3$) a un ritmo suficiente para mantener una concentración de 10^{-10} M en la sangre circulante. Para apreciar lo que significa esta concentración, calcule el diámetro de una piscina redonda, con una profundidad de 2,0 m, necesario para disolver 1,0 g (aproximadamente 1 cucharilla de café) de adrenalina a una concentración igual a la sanguínea.

9. Regulación de los niveles hormonales en sangre La vida media de la mayor parte de hormonas en la sangre es relativamente corta. Por ejemplo, si se inyecta insulina marcada radiactivamente a un animal, al cabo de 30 min la mitad de la hormona marcada ha desaparecido de la sangre.

(a) ¿Cuál es la importancia de la inactivación relativamente rápida de las hormonas circulantes?

(b) A la vista de esta rápida inactivación, ¿cómo puede mantenerse constante el nivel de hormonas circulantes en condiciones normales?

(c) ¿De qué manera puede conseguir el organismo unos cambios rápidos en los niveles de hormonas circulantes?

10. Hormonas hidrosolubles frente a hormonas liposolubles Según sus propiedades físicas, las hormonas se catalogan en dos categorías: las que son muy solubles en agua pero relativamente insolubles en lípidos (como la adrenalina) y las que son relativamente insolubles en agua pero muy solubles en lípidos (como las hormonas esteroideas). La mayor parte de las hormonas hidrosolubles no entran en el interior de sus células diana para ejercer su papel de reguladoras de la actividad celular. Las hormonas liposolubles, por el contrario, entran en sus células diana y finalmente ejercen su acción en el núcleo. ¿Cuál es la correlación entre la solubilidad, la localización de los receptores y el modo de acción de las dos clases de hormonas?

11. Diferencias metabólicas en el músculo y en el hígado en una situación de "luchar o escapar" Cuando un animal afronta una situación de "luchar o escapar" la liberación de adrenalina pone en marcha la degradación de glucógeno en el hígado, el corazón y el músculo esquelético. El producto final de la degradación del glucógeno en el hígado es la glucosa; el producto final en el músculo esquelético es el piruvato.

(a) ¿Por qué se observan diferentes productos de degradación del glucógeno en los dos tejidos?

(b) ¿Cuál es la ventaja para el organismo en una situación de "luchar o escapar" de tener estas rutas específicas para la degradación del glucógeno?

12. Exceso de secreción de insulina: hiperinsulinismo Ciertos tumores malignos del páncreas provocan una producción excesiva de insulina por las células β. Los individuos afectados manifiestan estremecimientos y temblores, debilidad y cansancio, transpiración y hambre.

(a) ¿Cuál es el efecto del hiperinsulinismo en el metabolismo hepático de los glúcidos, aminoácidos y lípidos?

(b) ¿Cuáles son las causas de estos síntomas? Sugiera por qué si se prolonga esta situación da lugar a lesiones cerebrales.

13. Termogénesis causada por las hormonas tiroideas Las hormonas tiroideas están íntimamente implicadas en la regulación del metabolismo basal. El tejido hepático de animales tratados con un exceso de tiroxina muestra un aumento de la tasa de consumo de O_2 y un aumento de la producción de calor (termogénesis), pero la concentración de ATP en el tejido es normal. Se han propuesto diferentes explicaciones para el efecto termogénico de la tiroxina. Una de ellas supone que el exceso de tiroxina provoca un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. ¿Cómo podría tal efecto explicar dichas observaciones? Otra explicación sugiere que la termogénesis es debida a un incremento en la velocidad de utilización del ATP por el tejido estimulado por la tiroxina. ¿Es ésta una explicación razonable? ¿Por qué?

14. Función de las prohormonas ¿Cuáles son las posibles ventajas de la síntesis de hormonas como prohormonas?

15. Fuentes de glucosa durante la inanición Un adulto humano típico consume unos 160 g de glucosa diarios, de los cuales 120 g son utilizados por el cerebro. Las reservas disponibles de glucosa son suficientes para un día (unos 20 g de glucosa circulante y unos 190 g de glucógeno). Una vez agotadas las reservas durante la inanición, ¿cómo podría obtener el cuerpo más glucosa?

16. Ratones parabióticos *ob/ob* Mediante cirugía cuidadosa es posible conectar los sistemas circulatorios de dos ratones, de manera que la misma sangre circule a través de los dos animales. En estos ratones **parabióticos,** los productos liberados en la sangre de un animal alcanzan al otro animal a través de la circulación compartida. Ambos animales pueden comer independientemente. Cuando un ratón *ob/ob* (con ambas copias del gen *OB* defectuosas) y un ratón normal *OB/OB* (dos copias normales del gen *OB*) se conviertan en parabióticos, ¿qué sucederá con el peso de cada ratón?

17. Cálculo del índice de masa corporal Un corpulento profesor de bioquímica pesa 118 kg y mide 173 cm. ¿Cuál es su índice de masa corporal? ¿Cuánto peso debería perder para disminuir el índice de masa corporal hasta 25 (normal)?

18. Secreción de insulina Prevea los efectos sobre la secreción de insulina por las células β pancreáticas de la exposición al ionóforo valinomicina (p. 404). Explique su predicción.

19. Efectos de la eliminación de un receptor de insulina Una cepa de ratones que carece específicamente del receptor de insulina del hígado muestra una ligera hiperglucemia en condiciones de ayuno (glucosa sanguínea = 132 mg/dL, frente a 101 mg/dL en los controles) y una más acusada hiperglucemia con alimentación normal (glucosa = 363 mg/dL, frente a 135 mg/dL en los controles). Los ratones tienen niveles anormalmente elevados de glucosa 6-fosfatasa en el hígado y niveles elevados de insulina en la sangre. Explique estas observaciones.

20. Decisiones sobre la seguridad de fármacos El fármaco Avandia (rosiglitazona) resulta efectivo para disminuir la glucosa sanguínea en pacientes con diabetes de tipo 2, pero también hay indicios de que puede comportar un aumento del riesgo de ataque cardíaco. Si tuviese la responsabilidad de decidir si este fármaco debería permanecer en el mercado (con las indicaciones pertinentes acerca de sus efectos secundarios) o ser retirado, ¿qué factores tendría en cuenta para tomar la decisión?

21. La medicación en la diabetes de tipo 2 Los fármacos acarbosa (Precose) y miglitol (Glyset), utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 2, inhiben las α-glucosidasas del borde en cepillo del intestino delgado. Estos enzimas degradan los oligosacáridos derivados del glucógeno y del almidón a monosacáridos. Sugiera un posible mecanismo para el efecto beneficioso de estos fármacos en los individuos con diabetes. ¿Qué efectos secundarios, si los hubiere, esperaría de estos fármacos? ¿Por qué? (Pista: revise la intolerancia a la lactosa, p.545).

Problema de análisis de datos

22. Clonaje del receptor de la sulfonilurea de las células β-pancreáticas El gliburide, un miembro de la familia de fármacos de la sulfonilurea, mostrada en la p. 925, se usa para tratar la diabetes de tipo 2. Se une al canal de K^+ regulado por ATP, mostrado en las Figuras 23–28 y 23–29 cerrándolo.

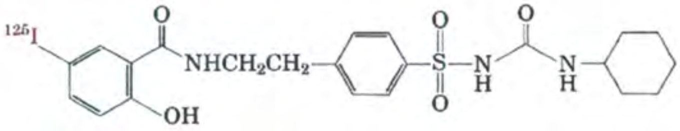
(a) A la vista del mecanismo mostrado en la Figura 23–28 ¿el tratamiento con gliburide resultaría en un aumento o en una disminución de la secreción de insulina por las células β pancreáticas?

(b) ¿De qué manera el tratamiento con gliburide ayuda a reducir los síntomas de la diabetes de tipo 2?

(c) ¿Esperaría que el gliburide fuese útil en el tratamiento de la diabetes de tipo 1? ¿Por qué?

Aguilar-Bryan y colaboradores (1995) clonaron el gen del receptor de la sulfonilurea (SUR) del hamster, que forma parte de los canales de K^+ controlados por ATP. El equipo de investigadores invirtió muchos esfuerzos para asegurar que el gen clonado fuese efectivamente el que codificaba el SUR. Discutiremos cómo es posible demostrar que se ha clonado el gen buscado y no un gen distinto.

El primer paso consistió en obtener la proteína SUR pura. Ya se sabía que fármacos como el gliburide se unían al SUR con gran afinidad ($K_d < 10$ nM), y que el SUR tenía una masa molecular entre 140 y 170 kDa. Aguilar-Bryan y colaboradores aprovecharon la gran afinidad del gliburide para marcar el SUR radiactivamente y así purificarlo a partir de un extracto celular. En primer lugar, prepararon un derivado del gliburide marcado con yodo radiactivo (^{125}I):



[^{125}I]5-Yodo-2-hidroxigliburide

(d) Estudios preliminares mostraron que el derivado del gliburide marcado con ^{125}I (en adelante [^{125}I]gliburide) tenía la misma K_d y propiedades de unión que el gliburide no modificado. ¿Por qué era necesario demostrar ésto? (¿Qué posibilidades alternativas quedaban descartadas?)

Aunque [^{125}I]gliburide se unía al SUR con gran afinidad, una cantidad significativa del fármaco marcado probablemente se disociaría del SUR durante la purificación. Para evitarlo había que entrecruzar covalentemente el [^{125}I]gliburide con el SUR. Hay muchos métodos para el entrecruzamiento covalente. Aguilar-Bryan y colaboradores usaron luz UV. Cuando las moléculas aromáticas se exponen a luz UV de corta longitud de onda pasan a un estado excitado que forma fácilmente enlaces covalentes con las moléculas vecinas. El entrecruzamiento del gliburide marcado con radiactividad con el SUR hizo posible seguir el SUR a lo largo del proceso de purificación simplemente siguiendo la radiactividad del ^{125}I.

Aguilar-Bryan y colaboradores trataron células HIT de hamster (que expresan el SUR) con [^{125}I]gliburide y luz UV, purificaron la proteína de 140 kDa marcada con [^{125}I] y secuenciaron 25 aminoácidos de su extremo aminoterminal, cuya secuencia fue PLAFCGTENHSAAYRVDQGVLNNGC. A continuación generaron anticuerpos que se unían a dos péptidos cortos de esta secuencia, uno a PLAFCGTE y el otro a HSAAYRVDQGV, y mostraron que estos anticuerpos se unían a la proteína purificada de 140 kDa marcada con [^{125}I].

(e) ¿Por qué era necesario incluir este paso de unión a los anticuerpos?

A continuación se diseñaron cebadores para PCR basados en las secuencias anteriores y clonaron un gen a partir de una genoteca de cDNA de hámster que codificaba una proteína que contenía estas secuencias (véase el Capítulo 9 para los métodos de la biotecnología).

El cDNA clonado del supuesto *SUR* hibridaba con un mRNA de la longitud apropiada presente en las células que conte-

nían SUR. El cDNA del supuesto *SUR* no hibridaba con ninguna fracción de mRNA del mRNA aislado de hepatocitos que no expresan el SUR.

(f) ¿Por qué era necesario incluir la etapa de hibridación entre el cDNA del supuesto *SUR* con el mRNA?

Finalmente, el gen clonado fue introducido y expresado en células COS, que normalmente no expresan el gen del *SUR*. A las células se les añadió [^{125}I]gliburide con o sin un gran exceso de gliburide no marcado, se expusieron las células a la luz UV y se midió la radiactividad de la proteína de 140 kDa obtenida. Los resultados se muestran en la tabla.

(g) ¿Por qué no se encontró proteína de 140 kDa marcada con ^{125}I en el experimento 2?

(h) ¿Cómo usaría la información de la tabla para argumentar que el cDNA codificaba el SUR?

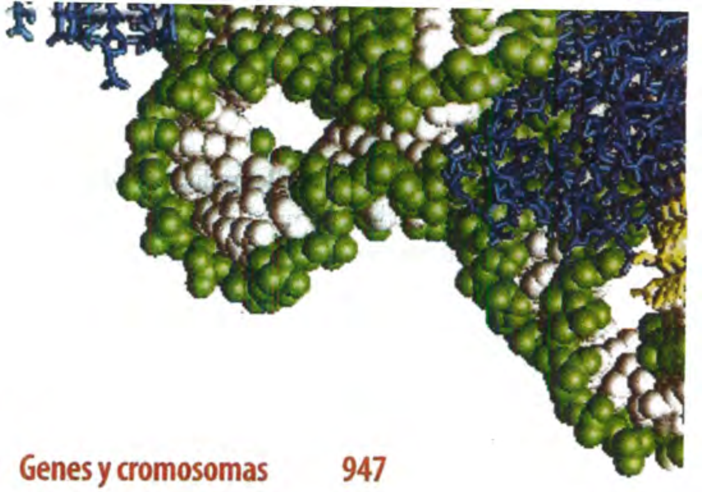
(i) ¿De qué otra información le gustaría disponer para asegurar haber clonado el gen *SUR*?

Experimento	Tipo celular	¿cDNA supuesto SUR añadido?	¿Exceso de gliburide no marcada?	Marcaje con ^{125}I en la proteína de 140 kDA
1	HIT	No	No	+++
2	HIT	No	Sí	–
3	COS	No	No	–
4	COS	Sí	No	+++
5	COS	Sí	Sí	–

Referencia

Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P. IV, Boyd, A.E. III, González, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., & Nelson, D.A. (1995) Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423–426.

PARTE III



LAS RUTAS DE LA INFORMACIÓN

24 Genes y cromosomas 947

25 Metabolismo del DNA 975

26 Metabolismo del RNA 1021

27 Metabolismo de las proteínas 1065

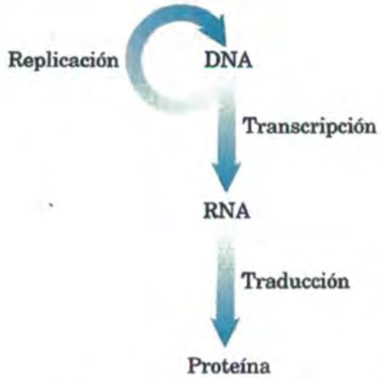
28 Regulación de la expresión génica 1115

La tercera y última parte de este libro explora los mecanismos bioquímicos subyacentes a las exigencias aparentemente contradictorias entre la estabilidad genética y la evolución de los organismos vivos. ¿Cuál es la naturaleza molecular del material genético? ¿De qué modo se transmite con fidelidad la información genética de generación en generación? ¿Cuál es el origen de los escasos cambios del material genético que son la materia prima de la evolución? ¿Cómo se expresa en último término la información genética en las secuencias de aminoácidos de la enorme variedad de moléculas proteicas de las células vivas?

El conocimiento que tenemos hoy en día de las rutas de la información es el resultado de la convergencia de disciplinas como la genética, la física y la química en la bioquímica moderna. Ello se resume en el descubrimiento de la estructura en doble hélice del DNA que llevaron a cabo James Watson y Francis Crick en 1953 (véase la Figura 8–13). La teoría genética aportó el principio de la codificación a cargo de los genes. La física hizo posible la determinación de la estructura molecular mediante el análisis de difracción de rayos X. La química desveló la composición del DNA. El profundo impacto que tuvo la hipótesis de Watson y Crick se debió a que fue capaz de integrar una amplia variedad de observaciones procedentes de estas diversas disciplinas.

Semejante revolución en la comprensión de la estructura del DNA inevitablemente planteó numerosas preguntas sobre su función. La estructura en doble hélice del DNA sugirió un mecanismo para su copia, de modo que la información en él contenida pudiera ser transmitida de generación en generación. La comprensión de cómo la información del DNA se convierte en proteínas funcionales vino con el descubrimiento del RNA mensajero y el RNA de transferencia y con la elucidación del código genético.

Estos y otros importantes avances llevaron a la formulación del dogma central de la biología molecular, que abarca los tres principales procesos celulares en los que se utiliza la información genética. El primero es la replicación, o copia del DNA parental para formar moléculas de DNA hijas con idéntica secuencia de nucleótidos. El segundo es la transcripción, proceso mediante el cual parte del mensaje genético codificado por el DNA es copiado



Dogma central de la biología molecular con indicación del sentido de los flujos de información en la replicación, la transcripción y la traducción. El término "dogma" es inadecuado y sólo se retiene por motivos históricos. Empleado por primera vez por Francis Crick, en un momento en que se disponía de pocas pruebas en favor de estas ideas, el dogma se ha convertido en un principio perfectamente establecido.

en forma de RNA. El tercero es la traducción, en la cual el mensaje genético codificado en el RNA mensajero es traducido en los ribosomas para dar un polipéptido con una secuencia específica de aminoácidos.

La Parte III estudia estos y otros procesos relacionados. En el Capítulo 24 examinamos la estructura, topología y empaquetamiento de los genes y los cromosomas. Los procesos relacionados con el dogma central se examinan en los Capítulos 25 a 27. Finalmente, abordaremos la regulación, examinando el control de la expresión de la información genética (Capítulo 28).

Un tema de gran importancia, presente a lo largo de estos capítulos, es la complejidad añadida inherente a la biosíntesis de las macromoléculas que contienen información. El ensamblaje de los ácidos nucleicos y de las proteínas con sus secuencias específicas de nucleótidos y aminoácidos debe respetar estrictamente nada menos que las características del molde en que esta basada la propia vida. La formación de los enlaces fosfodiéster en el DNA o de los enlaces peptídicos en las proteínas podría parecer una tarea trivial para las células, a la vista del arsenal de medios enzimáticos y químicos descrito en la Parte II de este libro. No obstante, cuando se trata de considerar los procesos que tienen relación con el tratamiento de la información, debe ampliarse el repertorio de modelos y de reglas establecido al considerar las vías metabólicas. En los biopolímeros implicados en el tratamiento de la información genética, los enlaces deben formarse entre subunidades *determinadas*, evitando los errores de secuencia o su propagación. Ello tiene una enorme importancia en la termodinámica, la química y la enzimología de los procesos biosintéticos. La formación del enlace peptídico requiere un aporte de sólo unos 21 kJ/mol de enlaces y puede ser catalizado por enzimas relativamente simples. En cambio, para sintetizar un enlace entre dos aminoácidos específicos en un punto particular de una cadena polipeptídica, la célula invierte unos 125 kJ/mol de energía química y hace uso de más de 200 enzimas, moléculas de RNA y proteínas especializadas. La química implicada en la formación del enlace peptídico no cambia a causa de estos requerimientos, pero la reacción básica está acompañada por procesos adicionales para asegurar que el enlace peptídico se forme entre aminoácidos determinados. La información es cara.

La interacción dinámica entre ácidos nucleicos y proteínas es otro tema central de la Parte III. Con la importante excepción de un reducido número de moléculas de RNA catalítico (descritas en los Capítulos 26 y 27), los procesos que constituyen las rutas por las que fluye la información en las células están catalizados y regulados por proteínas. La comprensión del modo de actuación de estos enzimas puede tener un valor tanto intelectual como práctico, puesto que constituye la base del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante (introducida en el Capítulo 9).

La evolución de nuevo constituye un tema panorámico. Muchos de los procesos esbozados en la Parte III se remontan a miles de millones de años atrás, y unos pocos hasta el LUCA, el último antepasado común universal. El ribosoma, gran parte del aparato de traducción y algunas partes de la maquinaria de transcripción son compartidos por todos los organismos vivos de este planeta. La información genética tiene las características de un reloj molecular que puede ayudar a definir las relaciones ancestrales entre especies. Las rutas de la información compartidas conectan a los humanos con todas las especies presentes en la Tierra y con todas las especies que les precedieron. La exploración de estas rutas está permitiendo levantar lentamente el telón sobre el primer acto: los sucesos que pudieron anunciar el principio de la vida sobre la Tierra.

> El superenrollamiento, de hecho, no se limita a actuar para el DNA como un eficaz potenciador; mantiene el anárquico e invasivo DNA dentro de los estrechos límites que la célula le ha reservado.
>
> —*Nicholas Cozzarelli,* Harvey Lectures, *1993*

24

Genes y cromosomas

24.1 Elementos cromosómicos 947

24.2 Superenrollamiento del DNA 954

24.3 Estructura de los cromosomas 962

El tamaño de las moléculas de DNA plantea un interesante problema biológico, pues su longitud es generalmente mucho mayor que las células o los virus que las contienen **(Fig. 24–1)**. ¿Cómo se empaquetan en los virus y en las células? Para responder a esta pregunta clave desplazaremos toda nuestra atención desde la estructura secundaria del DNA, examinada anteriormente en el Capítulo 8, hasta el enorme grado de organización requerido para el empaquetamiento terciario del DNA en los **cromosomas,** que contienen la información genética. En primer lugar, examinaremos los elementos constituyentes de los DNA víricos y de los cromosomas celulares, así como el tamaño y organización de estos últimos. A continuación, introduciremos la topología del DNA, describiendo el enrollamiento y el superenrollamiento de las moléculas de DNA. Consideraremos en último lugar las interacciones proteína–DNA que hacen posible la organización de los cromosomas en estructuras compactas.

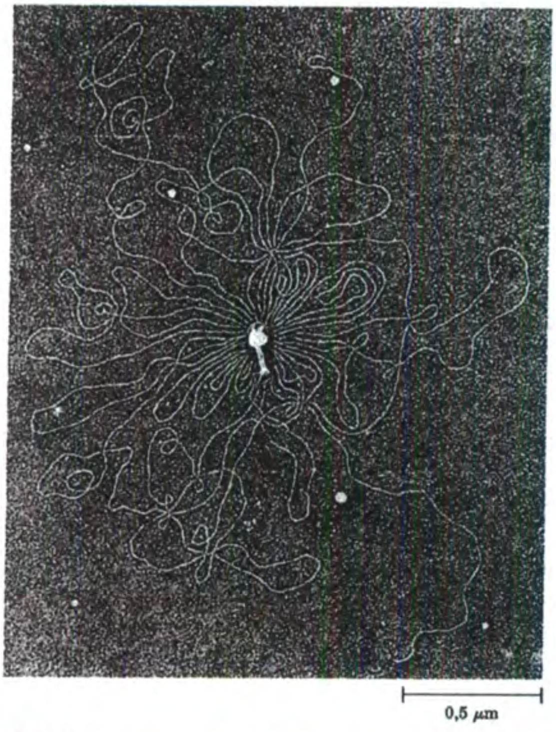


FIGURA 24–1 Cubierta proteica del bacteriófago T2 rodeada por su única molécula lineal de DNA. La lisis del bacteriófago con agua destilada libera el DNA, que se esparce sobre la superficie del agua. Una partícula de bacteriófago T2 sin dañar consiste en una cabeza que se prolonga en una cola, mediante la cual el bacteriófago se adhiere a la superficie externa de la célula bacteriana. La totalidad del DNA que se muestra en esta micrografía electrónica se encuentra empaquetado dentro de la cabeza del fago.

24.1 Elementos cromosómicos

El DNA celular contiene genes y también regiones intergénicas. Ambos tipos de DNA desempeñan funciones vitales para la célula. Los genomas más complejos de las células eucarióticas requieren niveles superiores de organización, cuyos detalles estructurales son observables en los cromosomas. Empezaremos examinando los diferentes tipos de secuencias de DNA y los elementos estructurales de los cromosomas.

Los genes son segmentos de DNA que codifican cadenas polipeptídicas y RNA

Nuestro conocimiento de los genes ha evolucionado enormemente a lo largo del siglo pasado. Según la biología clásica, un gen es una parte de un cromosoma que determina o afecta un solo carácter o **fenotipo** (propiedad visible), como, por ejemplo, el color de los ojos. Los científicos George Beadle y Edward Tatum propusieron en el año 1940 una definición molecular del gen. Estos investigadores expusieron esporas del moho *Neurospora crassa* al efecto de los rayos X y a otros agentes causantes de lesiones y alteraciones de la secuencia del DNA **(mutaciones).** Encontraron que algunos mutantes de cepas de hongos carecían de algún enzima específico, hecho que en ocasiones provocaba la paralización completa de toda una ruta metabólica del organismo. Estas observaciones hicieron que Beadle y Tatum llegaran a la conclusión de que un

gen es un segmento de material genético que determina o codifica un enzima: la hipótesis conocida como **un gen–un enzima.** Años más tarde este concepto fue ampliado a **un gen–una proteína,** puesto que muchos genes codifican proteínas no enzimáticas, o bien un polipéptido de una proteína con múltiples subunidades.

George W. Beadle, 1903–1989

Edward L. Tatum, 1909–1975

La definición bioquímica actual de gen es todavía más precisa. Se denomina **gen** a una secuencia de DNA que codifica un producto final, sea una proteína o un RNA, que tiene función estructural o catalítica. El DNA contiene también otros segmentos o secuencias con función puramente reguladora. Las **secuencias reguladoras** proporcionan señales que permiten identificar el principio y el final de los genes, influir en su transcripción o funcionar como puntos de inicio de la replicación o de la recombinación (Capítulo 28). Hay ciertos casos en que algunos genes pueden expresarse de formas diversas para generar diferentes productos génicos a partir de un segmento de DNA. Los mecanismos especiales de transcripción y traducción que lo hacen posible se describen posteriormente en los Capítulos 26 a 28.

El tamaño mínimo global de los genes que codifican proteínas puede calcularse de forma directa. Tal como se describirá detalladamente en el Capítulo 27, cada aminoácido de una cadena polipeptídica está codificado por una secuencia de tres nucleótidos consecutivos en una de las cadenas del DNA **(Fig. 24–2)**. Estos "codones" están dispuestos en una secuencia que corresponde a la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por el gen. A una cadena polipeptídica de tamaño medio de 350 aminoácidos le corresponderían 1.050 pares de bases. Muchos genes de organismos eucariotas y unos pocos de bacterias y arqueas se encuentran interrumpidos por segmentos de DNA no codificante y son, por tanto, considerablemente más largos que el tamaño sugerido mediante este sencillo cálculo.

¿Cuántos genes hay en un solo cromosoma? El cromosoma de *Escherichia coli*, uno de los genomas bacterianos que ha sido completamente secuenciado, es una molécula de DNA circular (en el sentido de un bucle sin fin más que de un círculo perfecto) de 4.639.675 pases de bases, que codifican unos 4.300 genes de proteínas y 157 genes de moléculas de RNA estructural o catalítico. Entre los organismos eucariotas, el genoma de unos 3.100 millones de pares de bases de los seres humanos contiene casi 29.000 genes repartidos en 24 cromosomas diferentes.

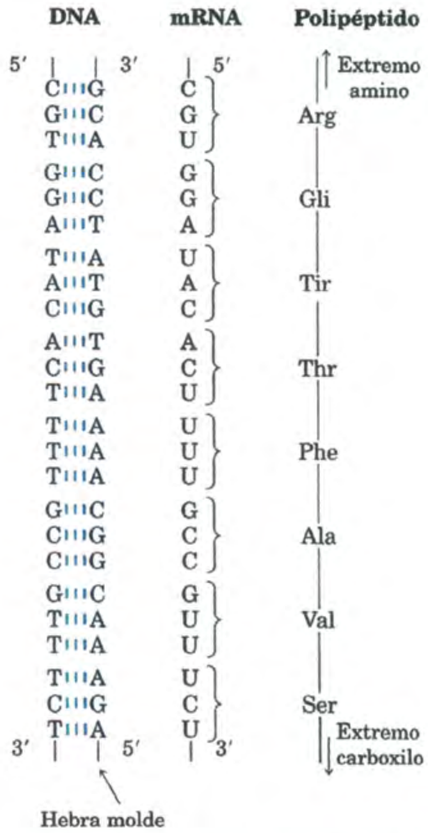


FIGURA 24–2 Colinealidad de las secuencias codificantes de nucleótidos del DNA y el mRNA y la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica. Los tripletes de nucleótidos del DNA determinan los aminoácidos de las proteínas con la mediación del mRNA. Una de las cadenas del DNA sirve de molde para la síntesis del mRNA, cuyos tripletes de nucleótidos (codones) son complementarios de los del DNA. En algunos genes bacterianos y en muchos eucarióticos, las secuencias codificantes están interrumpidas a intervalos por secuencias no codificantes (denominadas intrones).

Las moléculas de DNA son mucho más largas que las células o virus que las contienen

Los DNA cromosómicos son a menudo muchos órdenes de magnitud más largas que las células o virus que los contienen (Fig. 24–1; Tabla 24–1). Ello es así para todas las clases de organismos y parásitos víricos.

Virus Los virus no son organismos de vida libre; al contrario, son parásitos infecciosos que aprovechan los recursos de una célula huésped para llevar a cabo muchos de los procesos que requiere su propagación. A menudo las partículas víricas consisten solamente en un genoma (normalmente una única molécula de RNA o DNA) rodeado por una envoltura de naturaleza proteica.

Prácticamente todos los virus vegetales y algunos virus bacterianos y animales contienen RNA. Estos genomas son generalmente muy pequeños. Por ejemplo, los genomas de los retrovirus de los mamíferos, tales como el VIH, tienen unos 9.000 nucleótidos y el del bacteriófago Qβ tiene 4.220 nucleótidos. Ambos tipos de virus tienen genomas de RNA de cadena sencilla.

TABLA 24–1 Tamaño del DNA y de las partículas de algunos virus bacterianos (bacteriófagos)

Virus	Tamaño del DNA vírico (pb)	Longitud del DNA vírico (nm)	Dimensión mayor de la partícula vírica (nm)
ϕX174	5.386	1.939	25
T7	39.936	14.377	78
λ (lambda)	48.502	17.460	190
T4	168.889	60.800	210

Nota: Los datos sobre el tamaño del DNA corresponden a la forma replicativa (doble hebra). La longitud de contorno se calcula suponiendo que cada par de bases tiene un espesor de 3,4 Å (véase la Fig. 8–13).

Los genomas de los virus de DNA tienen tamaños muy variados (Tabla 24–1). Muchos DNA víricos son circulares durante al menos una parte de su ciclo vital. Durante la replicación vírica en el interior de una célula huésped pueden aparecer tipos específicos de DNA vírico denominados **formas replicativas;** muchos DNA lineales, por ejemplo, suelen circularizarse y todos los DNA monocatenarios se convierten en doble cadena. El bacteriófago λ (lambda) es un virus típico de DNA de tamaño mediano que infecta *E. coli*. En su forma replicativa en el interior de las células, el DNA de λ es una doble hélice circular. Este DNA de doble cadena contiene 48.502 pases de bases y tiene una longitud de contorno de 17,5 μm. El bacteriófago ϕX174 es un virus de DNA mucho más pequeño; el DNA de la partícula vírica es un círculo monohebra. Su forma replicativa de doble hebra contiene 5.386 pases de bases. Aunque los genomas víricos son pequeños, las longitudes de contorno de sus DNA son centenares de veces más largas que la dimensión más larga de las partículas víricas que los contienen (Tabla 24–1).

Bacterias Una única célula de *E. coli* contiene casi 100 veces más DNA que una partícula de bacteriófago λ. El cromosoma de una célula de *E. coli* es una única molécula de DNA circular de doble hebra cerrada covalentemente. Sus 4.639.675 pases de bases tienen una longitud de contorno de aproximadamente 1,7 mm, unas 850 veces la longitud de una célula de *E. coli* **(Fig. 24–3)**. Además del gran cromosoma de DNA circular que se encuentra en el nucleoide, muchas bacterias contienen una o más pequeñas moléculas de DNA circular que se encuentran libres en el citosol. Estos elementos extracromosómicos se denominan **plásmidos** (**Fig. 24–4**; véase también la p. 307). Los plásmidos tienen generalmente una longitud de unos pocos miles de pares de bases, aunque algunos pueden sobrepasar los 10.000 pb. Muchos plásmidos contienen información genética y se replican dando lugar a nuevos plásmidos que se incorporan a las células hijas en el momento de la división celular. Aparte de las bacterias, se han encontrado plásmidos en levaduras y otros tipos de hongos.

En muchos casos, los plásmidos no aportan ninguna ventaja aparente al huésped y su única función parece ser la autopropagación. Algunos plásmidos, sin embargo, son portadores de genes útiles para la bacteria huésped. Por ejemplo, algunos genes de plásmidos confieren a una bacteria resistencia frente a agentes antibacterianos. Por ejemplo, los plásmidos que contienen el gen del enzima β-lactamasa confieren resistencia a los antibióticos del tipo β-lactama, como la penicilina y la amoxicilina (véase la Fig. 6–28). Estos y otros plásmidos pueden pasar de una célula resistente al antibiótico a una célula sensible a los antibióticos, de la misma o de diferente especie bacteriana, convirtiendo en resistente a la célula receptora. El amplio uso de antibióticos en algunas poblaciones humanas ha actuado como una potente fuerza selectiva que ha favorecido la difusión de plásmidos portadores de resistencia a antibióticos en las bacterias patógenas (así como de elementos transponibles, descritos más adelante, que contienen genes similares), que ha provocado la aparición de cepas bacterianas resistentes a varios antibióticos. Los médicos son cada vez más reacios a recetar antibióticos, a no ser que sea indispensable. Por razones similares, se ha limitando el uso de antibióticos en la alimentación animal.

Eucariotas Una célula de levadura, uno de los eucariotas más simples, tiene 2,6 veces más DNA que una célula de *E. coli* (Tabla 24–2). Las células de *Drosophila*, la mosca del vinagre utilizada en estudios genéticos, contienen 35 veces más DNA que las de *E. coli*, y las células humanas tienen casi 700 veces más. Las células de muchas plantas y anfibios contienen todavía más DNA. El material genético de las células eucarióticas está distribuido en cromosomas, cuyo número diploide ($2n$) depende de la especie (Tabla 24–2). Por ejemplo, las células humanas somáticas tienen por ejemplo, 46 cromosomas **(Fig. 24–5)**. Cada uno de los cromosomas de una célula eucariótica, como la mostrada en la Figura 24–5a, contiene una única molécula de DNA dúplex muy larga. Las moléculas de DNA de los 24 tipos diferentes de cromosomas humanos (22 parejas análogas más los cromosomas sexuales X e Y) tienen longitudes que varían hasta en un factor de 25. Cada cromosoma eucariótico contiene un conjunto característico de genes.

La longitud del DNA de un genoma humano extendido (22 cromosomas más un cromosoma X y un cromosoma Y en los varones o dos cromosomas X en las mujeres) mide alrededor de un metro. La mayoría de células humanas son diploides y, por lo tanto, contienen un total de 2 m de DNA. Se estima que un cuerpo humano adulto contiene unas 10^{14} células y, por tanto, una longitud de DNA de 2×10^{11} km. Compárese esta longitud con la circunferencia de la Tierra (4×10^4 km) o con la distancia entre la Tierra y el Sol ($1,5 \times 10^8$ km) para constatar el extraordinario nivel de compactación del DNA que presentan nuestras células.

FIGURA 24–3 La longitud del cromosoma de *E coli* (1,7 mm) se representa en comparación con la longitud de una célula de *E. coli* (2μm).

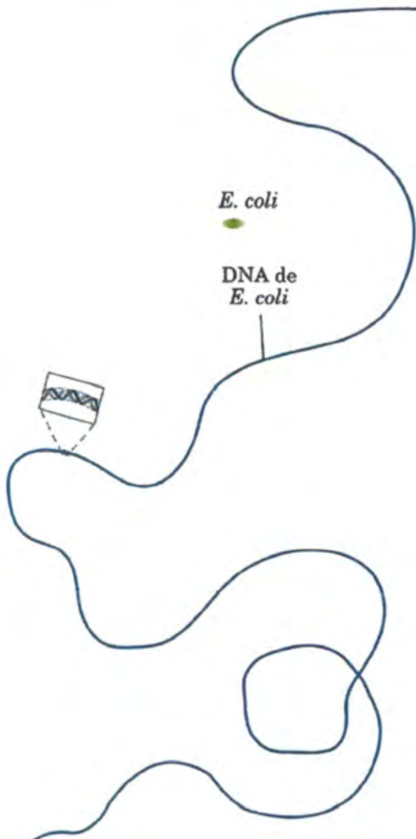


FIGURA 24–4 DNA de una célula lisada de *E. coli*. En esta micrografía electrónica, las flechas blancas indican la localización de varios DNA plasmídicos circulares y de pequeño tamaño. Los puntos negros y las manchas blancas son artefactos de la preparación.

TABLA 24–2 Contenido en DNA, genes y cromosomas de algunos genomas

	DNA total (pb)	Número de cromosomas*	Número aprox. de genes
Escherichia coli K12 (bacteria)	4.639.675	1	4.435
Saccharomyces cerevisiae (levadura)	12.080.000	16[†]	5.860
Caenorhabditis elegans (nemátodo)	90.269.800	12[‡]	23.000
Arabidopsis thaliana (planta)	119.186.200	10	33.000
Drosophila melanogaster (mosca de la fruta)	120.367.260	18	20.000
Oryza sativa (arroz)	480.000.000	24	57.000
Mus musculus (ratón)	2.634.266.500	40	27.000
Homo sapiens (ser humano)	3.070.128.600	46	29.000

Nota: Esta información está siendo constantemente actualizada. Para acceder a los datos más recientes, consulte las páginas web de los proyectos genoma individuales.

*Estos valores corresponden al número diploide de cromosomas excepto en la levadura.

†Número haploide de cromosomas. Las cepas salvajes de levadura generalmente poseen ocho (octaploides) o más conjuntos de estos cromosomas.

‡Número de las hembras con dos cromosomas X. Los machos tienen un X pero ningún Y; por tanto, 11 cromosomas en total.

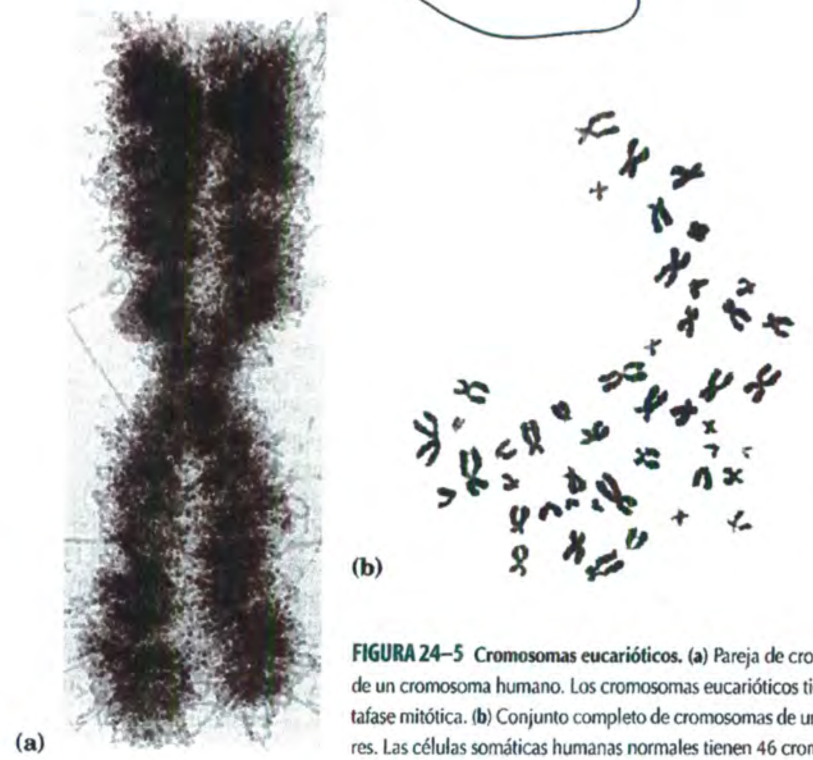


FIGURA 24–5 **Cromosomas eucarióticos.** (a) Pareja de cromátidas unidas y condensadas de un cromosoma humano. Los cromosomas eucarióticos tienen esta apariencia en la metafase mitótica. (b) Conjunto completo de cromosomas de un leucocito de uno de los autores. Las células somáticas humanas normales tienen 46 cromosomas.

Las células eucarióticas contienen orgánulos, mitocondrias (**Figura 24–6**) y cloroplastos que también contienen DNA. Las moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) son mucho más pequeñas que los cromosomas nucleares. En las células animales el mtDNA contiene menos de 20.000 pares de bases (16.569 pares de bases en el mtDNA humano) y es un dúplex circular. Cada mitocondria contiene normalmente de dos a diez copias de este mtDNA, pero su número puede aumentar hasta varios centenares en células embrionarias en proceso de diferenciación. En unos pocos organismos (por ejemplo, los tripanosomas) cada mitocondria contiene millares de copias de mtDNA organizadas en una compleja matriz entrelazada denominada cinetoplasto. El tamaño del mtDNA de las células vegetales varía entre 200.000 y 2.500.000 pares de bases. Las moléculas de DNA de los cloroplastos (cpDNA) también son dúplex circulares, cuyo tamaño varía entre 120.000 y 160.000 pares de bases. Se ha especulado mucho acerca del origen evolutivo de los DNA de las mitocondrias y los cloroplastos. Un punto de vista ampliamente aceptado supone que se trata de vestigios de los cromosomas de bacterias arcaicas que llegaron hasta el citoplasma de las células huésped y se convirtieron así en los precursores de estos orgánulos (véase la Fig. 1–36). El DNA mitocondrial codifica los tRNA y rRNA mitocondriales, así como un pequeño número de proteínas mitocondriales. Más del 95% de las proteínas de las mitocondrias están codificadas por el DNA nuclear. Las mitocondrias y los cloroplastos se dividen al dividirse la célula. Antes y durante la división de estos orgánulos, se replica su DNA y las moléculas de DNA hijas pasan a los orgánulos generados durante la división.

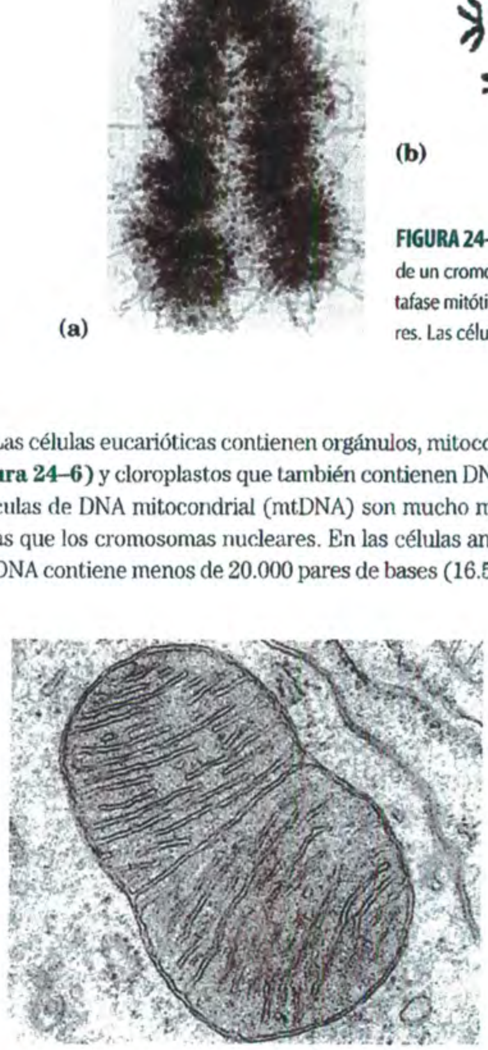


FIGURA 24–6 **Una mitocondria en división.** Algunas proteínas y RNA mitocondriales están codificados por una o dos copias de DNA mitocondrial (no visible en esta imagen). El DNA mitocondrial (mtDNA) se replica cada vez que se divide la mitocondria, antes de la división celular.

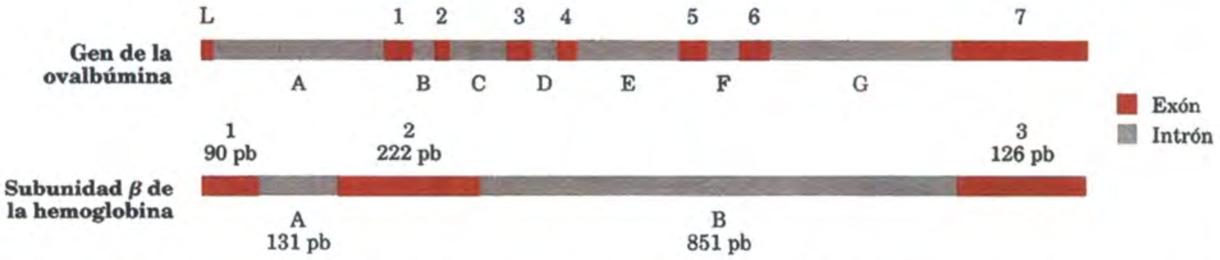


FIGURA 24–7 Intrones de dos genes eucarióticos. El gen de la ovoalbúmina tiene siete intrones (de A a G), que dividen las secuencias codificantes en ocho exones (L, y del 1 al 7). El gen de la subunidad β de la hemoglobina tiene dos intrones y tres exones, incluido un intrón que por sí solo contiene más de la mitad de los pares de bases del gen.

Los genes y los cromosomas eucarióticos son muy complejos

Las bacterias suelen tener un solo cromosoma por célula y en prácticamente todos los casos el cromosoma contiene únicamente una copia de cada gen. Unos pocos genes, como los del rRNA, están repetidos varias veces. Los genes y sus secuencias reguladoras ocupan gran parte del DNA en las bacterias. Además, casi todos los genes son exactamente colineales con la secuencia de aminoácidos (o de RNA) que codifican (Fig. 24–2).

La organización de los genes en el DNA eucariótico es mucho más compleja, tanto estructural como funcionalmente. El estudio de la estructura de los cromosomas eucarióticos y, más recientemente, la secuenciación de genomas eucarióticos enteros han deparado muchas sorpresas. Muchos genes eucarióticos, probablemente la mayor parte, tienen una estructura característica y sorprendente: sus secuencias de nucleótidos contienen uno o más segmentos intercalados de DNA que no codifican la secuencia de aminoácidos del producto polipeptídico. Estas inserciones no traducidas interrumpen la, por lo demás, precisa relación colineal entre la secuencia de nucleótidos del gen y la secuencia de aminoácidos del polipéptido que codifica. Estos segmentos de DNA no traducido se denominan **secuencias intercaladas** o **intrones,** y los segmentos codificantes se denominan **exones.** Pocos genes bacterianos contienen intrones.

En los eucariotas superiores, los genes tienen en general más secuencias en los intrones que en los exones. Por ejemplo, en el gen que codifica la única cadena polipeptídica de la proteína del huevo ovoalbúmina **(Fig. 24–7),** los intrones son mucho más largos que los exones; en total, siete intrones constituyen el 85% del DNA del gen. En el gen de la subunidad β de la hemoglobina, un solo intrón contiene más de la mitad del DNA del gen. El gen de la proteína muscular titina con 178 intrones es el campeón de los intrones. Los genes de las histonas parecen no tener intrones. La función de los intrones no está clara en la mayoría de casos. En total, sólo el 1,5% del DNA humano es "codificante", o exónico, con información para productos proteicos o RNA. Sin embargo, cuando los intrones, de mayor tamaño, se incluyen en el cómputo, los genes representan hasta el 30% del genoma humano.

La relativa escasez de genes en el genoma humano deja la función de una gran cantidad de DNA por definir. La **Figura 24–8** resume los tipos de secuencia del genoma humano.

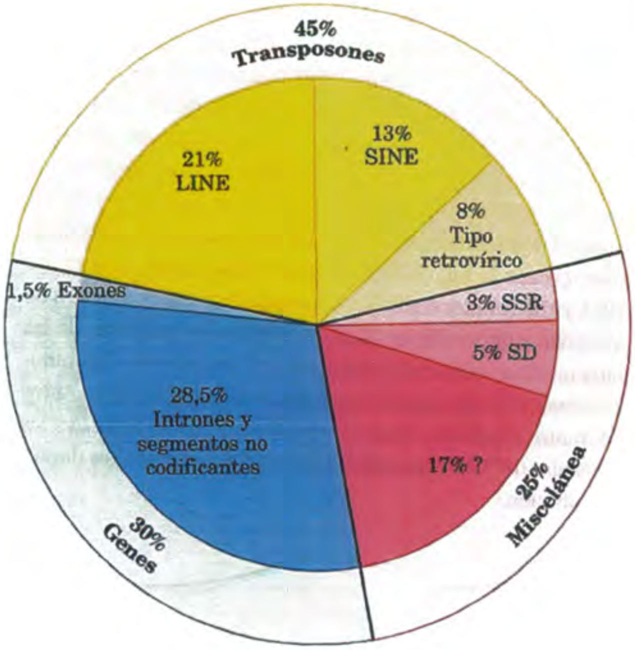


FIGURA 24–8 Tipos de secuencias del genoma humano. Este diagrama de sectores divide el genoma en transposones (elementos transponibles), genes y una miscelánea de secuencias diversas. Hay cuatro clases principales de transposones (de los que aquí se muestran tres). Los elementos largos diseminados (LINE) tienen de 6 a 8 kpb (1 kpb = 1.000 pb), normalmente contienen unos pocos genes que codifican proteínas que catalizan la transposición. El genoma posee unos 850.000 LINE. Los elementos cortos diseminados (SINE) tienen unos 100 a 300 pb de longitud. De los 1,5 millones presentes en el genoma humano, 1 millón son elementos Alu, así denominados porque generalmente contienen una copia de la secuencia de reconocimiento de *Alu*I, una endonucleasa de restricción (véase la Fig. 9–2). El genoma también contiene 450.000 copias de transposones de tipo retrovírico de 1,5 a 11 kpb de longitud. Aunque están "atrapados" en el genoma y no pueden moverse de una célula a otra, están relacionados evolutivamente con los retrovirus (Capítulo 26), entre los que se encuentra el VIH. La última clase de transposones (que representan <3% y que aquí no se muestra) consiste en una variedad de transposones residuales de muy diversa longitud.

Alrededor del 30% del genoma consiste en secuencias que forman parte de genes de proteínas, pero sólo una pequeña parte de este DNA forma parte de los exones (secuencias codificantes). La miscelánea de secuencias contiene repeticiones de secuencia simple (SSR) y duplicaciones de segmentos largos (SD), estas últimas presentes más de una vez en lugares distintos. Como se describe en el Capítulo 26, casi todo el genoma parece transcribirse como RNA, en gran parte sin caracterizar. También están presentes remanentes de transposones que la evolución ha alterado, por lo que son de difícil identificación.

Una gran parte del DNA no génico consiste en secuencias repetidas de diferentes tipos. Tal vez lo más sorprendente sea que alrededor de la mitad del genoma humano consista en secuencias moderadamente repetitivas derivadas de elementos transponibles, segmentos de DNA de unos pocos centenares a varios miles de pares de bases de longitud que pueden moverse de un lugar a otro del genoma. Los elementos transponibles (transposones) son un tipo de parásito molecular, que se aloja eficazmente en el genoma del huésped. Muchos poseen genes que codifican las proteínas que catalizan el proceso de transposición, que se describe con mayor detalle en los Capítulos 25 y 26. Algunos transposones del genoma humano son activos, con una baja frecuencia de transposición, pero la mayoría son reliquias inactivas alteradas por mutación a lo largo de la evolución. A pesar de que estos elementos generalmente no codifican proteínas o RNA, han jugado un importante papel en la evolución humana: el movimiento de los transposones puede propiciar la redistribución de otras secuencias genómicas.

Aproximadamente un 3% del genoma humano consiste en secuencias **altamente repetitivas,** también denominadas **DNA de secuencia simple o repeticiones de secuencia simple (SSR).** Estas secuencias cortas, generalmente de menos de 10 pares de bases, pueden estar repetidas millones de veces. El DNA de secuencia simple también ha sido denominado **DNA satélite,** porque su inusual composición de bases hace que migre como bandas "satélite" (separadas del resto del DNA) cuando se centrifugan muestras de DNA celular fragmentado en gradientes de densidad de cloruro de cesio. No parece que el DNA de secuencia simple codifique proteínas o RNA. En contraste con los elementos transponibles, el DNA altamente repetitivo puede que tenga una importancia funcional identificable en el metabolismo celular humano, puesto que en buena parte está asociado con dos importantes estructuras de los cromosomas eucarióticos: los centrómeros y los telómeros.

El **centrómero (Fig. 24–9)** consiste en una secuencia de DNA que actúa de punto de unión de las proteínas que fijan el cromosoma al huso mitótico. Esta unión resulta esencial para que se produzca la segregación igual y ordenada de los conjuntos de cromosomas entre las células hijas durante la división celular. Se han aislado y estudiado los centrómeros de los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae*. Las secuencias esenciales para la función de los centrómeros tienen aproximadamente 130 pares de bases y son muy ricas en pares A=T. Los centrómeros de los eucariotas superiores son mucho más largos y, a diferencia de los de la levadura, generalmente contienen DNA de secuencia simple, que consiste en miles de copias en tándem de una o unas pocas secuencias cortas de 5 a 10 pares de bases en la misma orientación. Todavía no se conoce el papel exacto del DNA de secuencia simple en la función del centrómero.

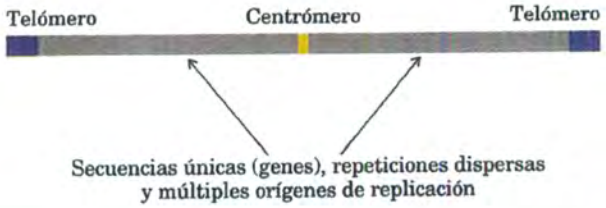


FIGURA 24–9 Elementos estructurales importantes de un cromosoma de levadura.

TABLA 24–3 Secuencias teloméricas

	Secuencia telomérica repetitiva
Homo sapiens (ser humano)	$(TTAGGG)_n$
Tetrahymena thermophila (protozoo ciliado)	$(TTGGGG)_n$
Saccharomyces cerevisiae (levadura)	$((TG)_{1-3}(TG)_{2-3})_n$
Arabidopsis thaliana (planta)	$(TTTAGGG)_n$

Los **telómeros** (del griego *telos*, "extremo") son secuencias con función estabilizadora del cromosoma situadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Los telómeros terminan con secuencias del tipo

$$(5')(T_xG_y)_n$$
$$(3')(A_xC_y)_n$$

donde x e y suelen oscilar entre 1 y 4 (Tabla 24–3). El número de repeticiones en el telómero, n, está entre 20 y 100 en la mayoría de eucariotas unicelulares y es generalmente superior a 1.500 en los mamíferos. Los extremos de una molécula lineal de DNA no pueden ser replicados de manera rutinaria por la maquinaria de replicación celular (ello puede ser una de las causas de la circularidad de las moléculas de DNA bacteriano). Las secuencias repetidas de los telómeros se añaden a los extremos de los cromosomas eucarióticos principalmente por el enzima telomerasa (véase la Fig. 26–39).

Se han construido cromosomas artificiales (Capítulo 9) con el propósito de comprender mejor el significado funcional de muchas de las características estructurales de los cromosomas eucarióticos. Un cromosoma artificial y lineal requiere para ser razonablemente estable solamente tres componentes: un centrómero, los telómeros en los extremos y las secuencias que controlan el inicio de la replicación del DNA. Los cromosomas artificiales de levadura (YAC; véase la Fig. 9–7) han sido desarrollados respondiendo a los requerimientos de la investigación biotecnológica. Análogamente, se están desarrollando cromosomas artificiales humanos (HAC) para el tratamiento de enfermedades genéticas por terapia génica somática (véase el Recuadro 9–2 sobre la terapia génica somática).

RESUMEN 24.1 Elementos cromosómicos

- Los genes son segmentos de un cromosoma que contienen la información de un polipéptido funcional o una molécula de RNA. Además de los genes, los cromosomas contienen diversas secuencias reguladoras implicadas en la replicación, la transcripción y otros procesos.
- El DNA genómico y las moléculas de RNA son generalmente varios órdenes de magnitud más largas que las partículas víricas o las células que los contienen.
- Muchos genes de las células eucarióticas (pero unos pocos en las bacterias y arqueas) están interrumpidos por secuencias no codificantes, los intrones. Los segmentos codificantes separados por los intrones se denominan exones.

- Los genes representan menos de un tercio del DNA genómico humano. El DNA restante consiste en secuencias repetidas de diversos tipos. Los ácidos nucleicos parásitos, conocidos como transposones, representan la mitad del genoma humano.
- Los cromosomas eucarióticos poseen dos importantes secuencias de DNA repetitivo con funciones especiales: los centrómeros, que son los lugares de unión del uso mitótico, y los telómeros, localizados en los extremos de los cromosomas.

24.2 Superenrollamiento del DNA

Hemos visto que el DNA celular está altamente compactado, lo cual implica un alto grado de organización estructural. El mecanismo de plegamiento del DNA debe permitir no sólo empaquetar el DNA, sino también acceder a la información contenida en el DNA. Antes de considerar como se consigue esto en procesos tales como la replicación y la transcripción debemos examinar una importante propiedad de la estructura del DNA, conocida como **superenrollamiento.**

El término "superenrollamiento" se refiere al enrollamiento de una hélice. Un hilo telefónico es un ejemplo típico de cable enrollado. El trayecto seguido por el hilo entre la base del teléfono y el auricular a menudo presenta una o más superhélices **(Fig. 24–10)**. El DNA está enrollado formando una doble hélice, en la que ambas cadenas se enrollan alrededor de un eje. El enrollamiento del eje sobre sí mismo **(Fig. 24–11)** produce el superenrollamiento. Como se detalla más adelante, el superenrollamiento del DNA es generalmente la manifestación de una tensión estructural. Cuando no hay enrollamiento neto del eje del DNA sobre sí mismo, se dice que el DNA se encuentra **relajado.**

Podríamos haber predicho que la compactación del DNA implica alguna forma de superenrollamiento. Quizá no resulte tan evidente que la replicación y la transcripción del DNA y el superenrollamiento se influyan recíprocamente. Tanto la replicación como la transcripción requieren la separación de las cadenas del DNA, y éste no es un proceso sencillo en una estructura con dos cadenas entrelazadas helicoidalmente (tal como se muestra en la **Fig. 24–12**).

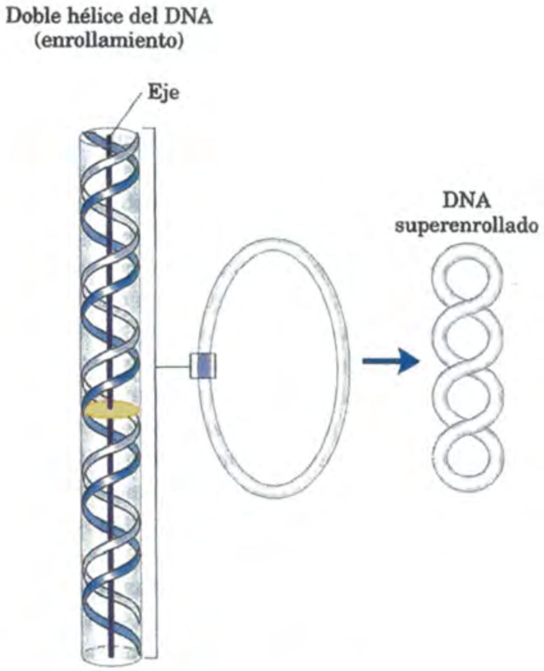


FIGURA 24–11 Superenrollamiento del DNA. Cuando el eje de la doble hélice del DNA se enrolla sobre sí mismo forma una nueva hélice (superhélice). El DNA con vueltas superhelicoidales se llama DNA superenrollado.

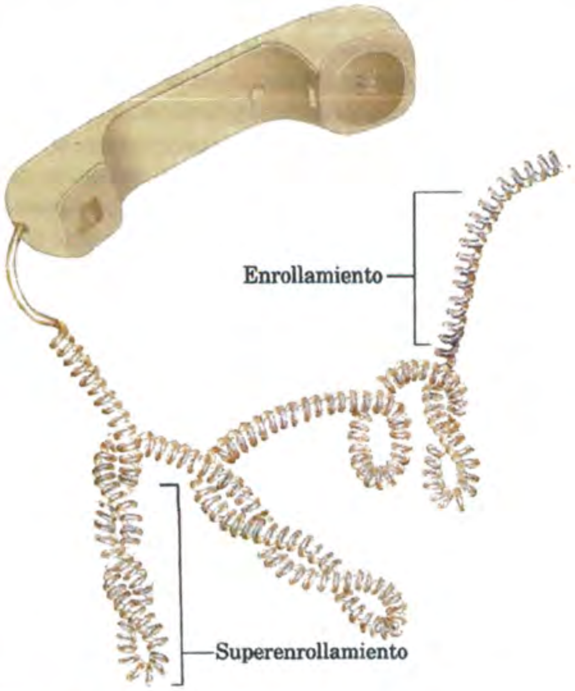


FIGURA 24–10 Superenrollamientos. Un cable de teléfono típico está enrollado como el DNA y el cable enrollado puede a su vez enrollarse en una superhélice. Este ejemplo es especialmente adecuado, pues el examen de los cables del teléfono ayudó a Jerome Vinograd y colaboradores a comprender que muchas propiedades de los pequeños DNA circulares podían explicarse por el superenrollamiento. Ellos fueron los primeros en descubrir en 1965 la presencia de superenrollamiento del DNA en pequeños DNA víricos circulares.

FIGURA 24–12 Superenrollamiento producido por la separación de las hebras de una estructura helicoidal. Enrolle dos tiras de goma para que formen una doble hélice dextrógira, tal como muestra la figura. Con la ayuda de otra persona, fije uno de los extremos y, a continuación, separe las dos tiras por el otro extremo. La tensión resultante producirá superenrollamiento.

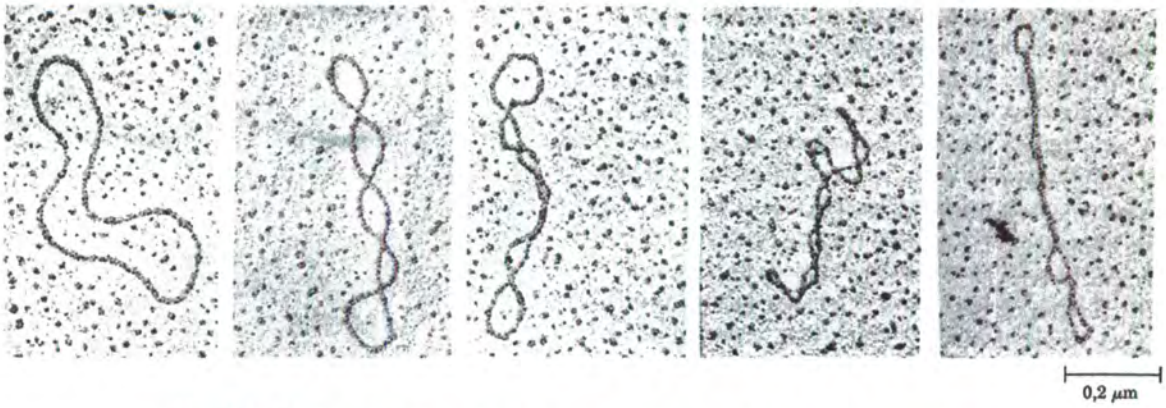


FIGURA 24–13 DNA plasmídicos relajados y superenrollados. La molécula más a la izquierda está relajada; el grado de superenrollamiento aumenta de izquierda a derecha.

El superenrollamiento del DNA densamente empaquetado en el núcleo celular parecería lógico y hasta trivial si no fuera por una circunstancia adicional: muchas moléculas de DNA circular siguen estando altamente superenrolladas incluso después de ser extraídas y purificadas de proteínas y otros componentes celulares. Ello demuestra que el superenrollamiento es una característica intrínseca e importante de la estructura terciaria del DNA, que se manifiesta en todos los DNA celulares y que se encuentra estrictamente regulada en todas las células.

Se han determinado varias propiedades medibles del superenrollamiento, y el estudio del mismo ha permitido aclarar muchos aspectos de la estructura y la función del DNA. Este trabajo se ha basado en gran medida en una rama de las matemáticas denominada **topología,** que estudia las propiedades de los objetos que se mantienen invariables cuando éstos son sometidos a deformaciones continuas. En el caso del DNA, las deformaciones continuas incluyen los cambios conformacionales debidos a las fluctuaciones térmicas o a la interacción con proteínas u otras moléculas. Las deformaciones discontinuas implican la rotura de las cadenas del DNA. Para moléculas de DNA circulares, una propiedad topológica es, pues, aquella que no se ve afectada por deformaciones de las cadenas del DNA, con tal que no se produzcan roturas. Las propiedades topológicas se alteran solamente por rotura y posterior empalme de una o ambas cadenas del DNA.

A continuación examinaremos las propiedades fundamentales y las bases físicas del superenrollamiento.

La mayor parte del DNA celular se encuentra subenrollado

Para comprender el superenrollamiento debemos concentrarnos en las propiedades de los DNA circulares de pequeño tamaño, como los plásmidos y algunos DNA víricos. Cuando estos DNA no tienen cortes en ninguna de las dos hebras se denominan **DNA circulares cerrados.** Si el DNA que forma la molécula circular cerrada adopta una conformación cercana a la estructura de la forma B (la estructura de Watson y Crick; véase la Fig. 8–13), con una vuelta de la doble hélice cada 10,5 pares de bases, el DNA se encontrará relajado en lugar de superenrollado (**Fig. 24–13**). El superenrollamiento se produce cuando el DNA está sometido a algún tipo de tensión estructural. El DNA circular cerrado purificado, con independencia de su origen biológico, raramente se encuentra relajado. Además, los DNA procedentes de un determinado tipo celular tienden a poseer un grado de superenrollamiento característico. La estructura del DNA se encuentra, pues, sometida a una tensión, cuya magnitud está regulada por la célula con objeto de inducir el superenrollamiento.

En general, la tensión es el resultado de un **desenrollamiento** de la doble hélice en el DNA circular cerrado. Dicho de otro modo, el DNA tiene *menos* vueltas helicoidales de lo que sería de esperar para la estructura en forma B. Los efectos del desenrollamiento se ilustran en la **Figura 24–14**. Un segmento de 84 pares de bases de DNA circular relajado contiene ocho

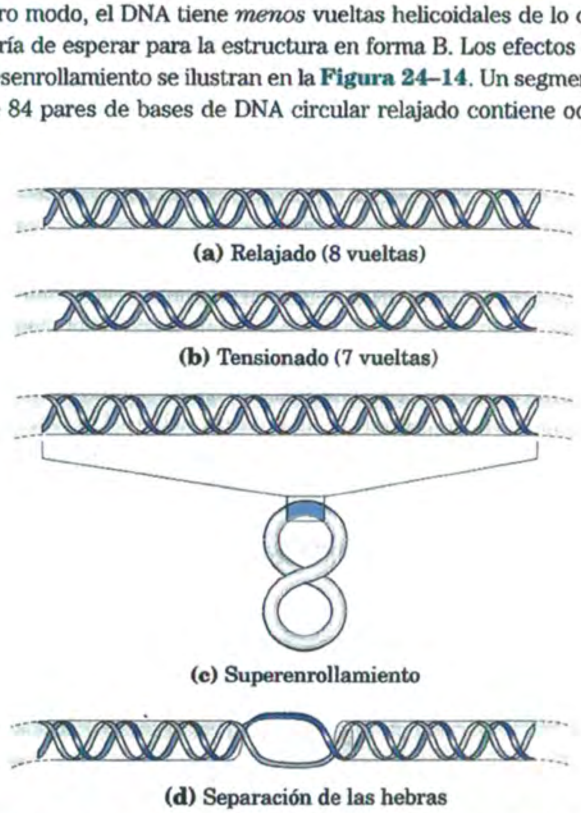


FIGURA 24–14 Efectos del desenrollamiento del DNA. (a) Segmento de DNA de 84 pares de bases, que forma parte de una molécula de DNA circular cerrada en su forma relajada con ocho vueltas de hélice. **(b)** La eliminación de una vuelta genera una tensión estructural. **(c)** La tensión es acomodada, en general, por el superenrollamiento. **(d)** El desenrollamiento del DNA también facilita la separación de las hebras. En principio, cada vuelta eliminada debería facilitar la separación de las hebras en una longitud de unos 10 pares de bases, tal como se indica. Sin embargo, los puentes de hidrógeno de los pares de bases impiden la separación de las hebras sobre distancias tan cortas y el efecto sólo resulta importante en DNA más largos y con niveles superiores de desenrollamiento.

vueltas de la doble hélice, o una vuelta cada 10,5 pares de bases. Si se eliminase una vuelta, habría 84 pb/7 = 12,0 pb por vuelta en lugar de los 10,5 que se observan en el B-DNA (Fig. 24–14b). Ello supondría una desviación respecto a la forma más estable del DNA, y como resultado la molécula sufriría una tensión termodinámica. Normalmente la mayor parte de esta tensión se absorbería por el enrollamiento del eje del DNA sobre sí mismo para formar una superhélice (Fig. 24–14c; una parte de la tensión se dispersaría en la estructura desenrollada de la molécula más grande de DNA). En principio, la tensión también podría absorberse separando las dos hebras a lo largo de una distancia de unos 10 pares de bases (Fig. 24–14d). En el DNA circular cerrado purificado, la tensión producida por el desenrollamiento es acomodada habitualmente por el superenrollamiento, no por la separación de las hebras, porque la espiralación del eje del DNA requiere menos energía que la rotura de los puentes de hidrógeno que estabilizan los pares de bases. Sin embargo, hay que señalar que el desenrollamiento del DNA in vivo facilita la separación de las hebras del DNA y, por tanto, facilita el acceso a la información que contienen.

Todas las células desenrollan activamente su DNA con la ayuda de procesos enzimáticos (descritos más adelante), y el estado tensionado resultante constituye una forma de almacenamiento de energía. Las células mantienen el DNA bajo tensión para facilitar su compactación por superenrollamiento. Además, el desenrollamiento del DNA es importante para los enzimas del metabolismo del DNA que deben facilitar la separación de las hebras como una parte de sus funciones.

El estado desenrollado puede mantenerse únicamente si el DNA es un círculo cerrado o si se encuentra unido y estabilizado por proteínas, de manera que las hebras no tengan libertad de rotación una en torno de la otra. Si se produce un corte en una de las cadenas de un DNA circular sin proteínas, la libre rotación en este punto hará que el DNA revierta de modo espontáneo al estado relajado. Sin embargo, en un DNA circular cerrado, el número de vueltas de la hélice es fijo y no puede cambiar sin al menos un corte transitorio en una de las hebras. Por tanto, el número de vueltas de la hélice de una molécula de DNA constituye una representación precisa del superenrollamiento.

El desenrollamiento del DNA se define por el número de enlace topológico

Varias ideas que son de utilidad en esta discusión proceden del campo de la topología, en especial el concepto de **número de enlace.** El número de enlace es una propiedad topológica del DNA de doble cadena, pues no varía a consecuencia de la curvatura o la deformación del DNA, siempre que las dos cadenas permanezcan intactas. El número de enlace (Lk) se ilustra en la **Figura 24–15**.

Empecemos visualizando la separación de las dos cadenas de un DNA circular de doble cadena. Si las dos hebras están ligadas como se muestra en la Figura 24–15a, se encuentran efectivamente unidas por un enlace que denominaremos topológico. Incluso si todos los enlaces de hidrógeno y las interacciones de apilamiento de las bases fuesen eliminados, de modo que las cadenas ya no estuviesen en contacto físico, este enlace topológico continuaría manteniendo las dos cadenas unidas. Podemos suponer que una de las dos hebras es el límite de una superficie (como por ejemplo una película de jabón que ocupara todo el espacio limitado por un alambre circular antes de hinchar una pompa de jabón). El número de enlace puede definirse como el número de veces que la segunda hebra atraviesa esta superficie. Para la molécula de la Figura 24–15a, $Lk = 1$; para la molécula de la Figura 24–15b, $Lk = 6$. El número de enlace de un DNA circular cerrado es siempre un número entero. Por convención, si los enlaces entre las dos cadenas de DNA están dispuestos de tal forma que las dos hebras se hallen entrelazadas siguiendo una hélice dextrógira, el número de enlace se considera positivo (+). El número de enlace es negativo (−) para un entrelazamiento en hélice levógira. En la práctica, no encontraremos números de enlace negativos en el DNA.

(a) $Lk = 1$

(b) $Lk = 6$

FIGURA 24–15 El número de enlace, *Lk*. Aquí, como de costumbre, las hebras del DNA están representadas por cintas azules. La molécula **(a)** tiene un $Lk = 1$. La **(b)** tiene un $Lk = 6$. Con propósito ilustrativo, una de las hebras de **(b)** se representa sin torsión para definir así el borde de una superficie imaginaria (sombreada en azul). El número de veces que la hebra con torsión cruza esta superficie define con precisión el valor del número de enlace.

Podemos ahora aplicar estas ideas a un DNA circular cerrado con 2.100 pb **(Fig. 24–16a)**. Para una molécula relajada, el número de enlace es simplemente el número de pares de bases dividido por 10,5; por tanto, en este caso, $Lk = 200$. Para que una molécula de DNA circular tenga una propiedad topológica tal como el número de enlace, no debe haber ningún corte en ninguna de las dos hebras. Si hubiera un corte en cualquiera de las dos hebras, en principio sería posible desenrollar y separar las hebras completamente. En este caso no existe enlace topológico y Lk no está definido (Fig. 24–16b).

Ahora podemos describir el desenrollamiento del DNA en términos de los cambios del número de enlace. El número de enlace del DNA relajado, designado por Lk_0, se toma como referencia. En la molécula de la Figura 24–16a, $Lk = 200$; si elimináramos dos vueltas en la molécula, Lk_0 sería igual a 198. Este cambio puede ser descrito por la ecuación:

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 \qquad (24\text{–}1)$$
$$= 198 - 200 = -2$$

A menudo resulta conveniente expresar la variación del número de enlace en términos de una magnitud independiente de la longitud de la molécula de DNA. Esta magnitud, denominada

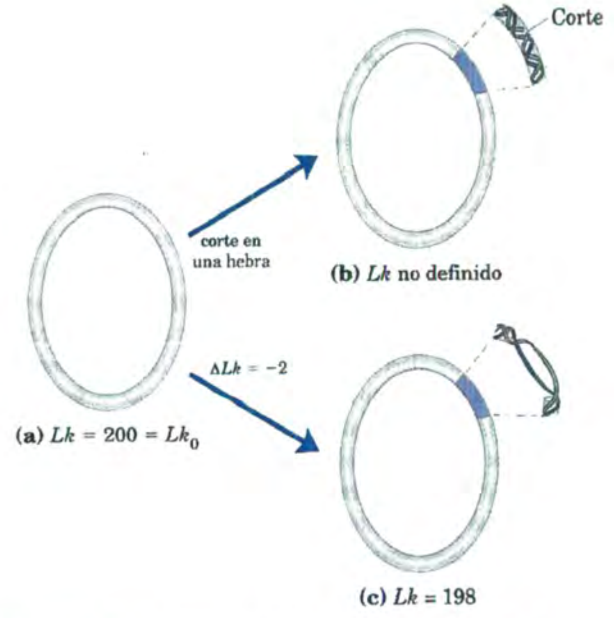


FIGURA 24–16 El número de enlace de las moléculas de DNA circular cerrado. Se presentan tres formas de un DNA circular de 2.100 pares de bases: **(a)** relajado, *Lk* = 200; **(b)** relajado con una mella (corte) en una de las cadenas, *Lk* no definido; **(c)** desenrollado con dos vueltas menos, *Lk* = 198. La molécula desenrollada generalmente se encuentra superespiralada, pero el desenrollamiento también facilita la separación de las hebras de DNA.

diferencia de enlace específica (σ), o **densidad superhelicoidal,** es una medida del número de vueltas eliminadas con respecto a las presentes en el DNA relajado:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0} \qquad (24\text{–}2)$$

En el ejemplo de la Figura 24–16c, $\sigma = -0{,}01$, lo que significa que el 1% (2 de 200) de las vueltas de la hélice del DNA (en forma B) han sido eliminadas. El grado de desenrollamiento del DNA celular suele oscilar entre un 5% y un 7%; es decir, $\sigma = -0{,}05$ a $-0{,}07$. El signo negativo de σ indica que la variación del número de enlace se debe al desenrollamiento del DNA. El superenrollamiento inducido por el desenrollamiento se define, por tanto, como superenrollamiento negativo. Por el contrario, en determinadas condiciones, el DNA puede estar sobreenrollado, y entonces el superenrollamiento resultante se define como positivo. Obsérvese que la trayectoria descrita por el eje de la hélice de DNA cuando el DNA está desenrollado (superenrollamiento negativo) es la imagen especular de la descrita por el DNA sobrenrollado (superenrollamiento positivo) **(Fig. 24–17)**. El superenrollamiento no es un proceso al azar; la vía del superenrollamiento depende en gran medida de la tensión torsional aplicada al DNA que aumenta o disminuye el número de enlace en relación con el B-DNA.

El número de enlace puede variar en ±1 mediante el corte de una de las hebras del DNA, la rotación de 360° de uno de los extremos alrededor de la hebra intacta y el empalme de los extremos cortados. Este proceso no tiene ningún efecto sobre el número de pares de bases ni sobre el número de átomos de la molécula de DNA circular. Dos formas de un DNA circular que difieran únicamente en una propiedad topológica como el número de enlace se conocen como **topoisómeros.**

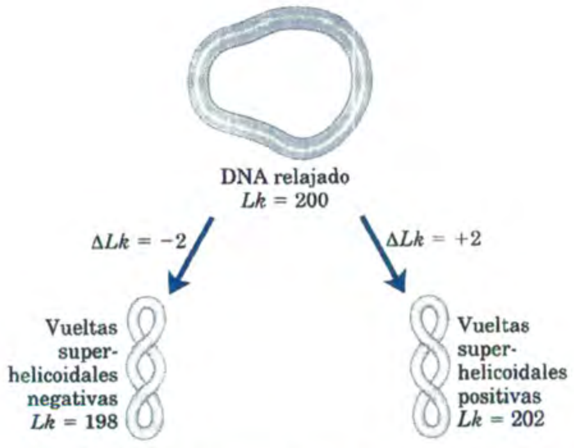


FIGURA 24–17 Superenrollamientos positivos y negativos. En la molécula relajada de la Figura 24–16a, un desenrollamiento o un sobrenrollamiento de dos vueltas helicoidales (*Lk* = 198 o 202) producirá un superenrollamiento negativo o positivo, respectivamente. Obsérvese que el eje del DNA se retuerce en direcciones opuestas en los dos casos.

EJEMPLO PRÁCTICO 24–1 Cálculo de la densidad superhelicoidal

¿Cuál es la densidad superhelicoidal (σ) de un DNA circular cerrado con una longitud de 4.200 pb y un número de enlace (*Lk*) de 374? ¿Cuál es la densidad superhelicoidal del mismo DNA cuando *Lk* es 412? Estas moléculas ¿están superenrolladas negativa o positivamente?

Solución: En primer lugar tiene que calcular Lk_0 dividiendo la longitud del DNA circular cerrado (en pb) por 10,5 pb/vuelta: (4.200 pb)/(10,5 pb/vuelta) = 400. Puede calcular ahora ΔLk a partir de la ecuación 24–1: $\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 374 - 400 = -26$. Sustituyendo los valores de ΔLk y Lk_0 en la ecuación 24–2: $\sigma = \Delta Lk/Lk_0 = -26/400 = -0{,}065$. Dado que la densidad superhelicoidal es negativa, esta molécula de DNA está superenrollada negativamente.

Cuando la molécula tiene un *Lk* de 412, $\Delta Lk = 412 - 400 = 12$ y $\sigma = 12/400 = 0{,}03$. La densidad superhelicoidal es positiva y la molécula está superenrollada positivamente.

El número de enlace puede resolverse en dos componentes estructurales denominados **torsión (*Tw*)** y **retorcimiento (*Wr*) (Fig. 24–18)**. Estos dos conceptos son más difíciles de describir que el número de enlace, pero puede considerarse que el retorcimiento es una medida del enrollamiento del eje de la hélice y que la torsión depende de la torsión local, es decir, del ángulo entre pares de bases adyacentes. Cuando se produce un cambio en el número de enlace, la tensión resultante es compensada en parte por el retorcimiento (superenrollamiento) y en parte por cambios en la torsión, según la ecuación

$$Lk = Tw + Wr$$

Tw y *Wr* no tienen que ser necesariamente números enteros. La torsión y el retorcimiento son propiedades geométricas, no topológicas, porque pueden variar a consecuencia de la deformación de la molécula de DNA circular cerrada.

Aparte de causar el superenrollamiento y favorecer la separación de las hebras, el desenrollamiento del DNA facilita la

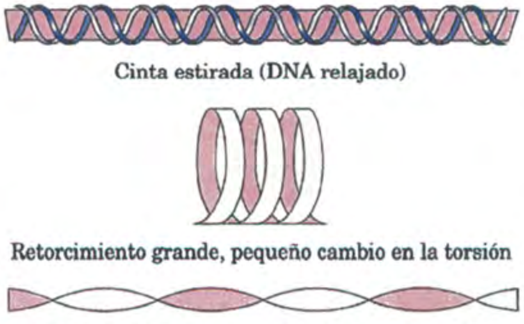


FIGURA 24–18 Modelo de cintas para ilustrar la torsión y el retorcimiento. La cinta rosa representa el eje de una molécula de DNA relajada. La tensión producida por la torsión de la cinta (desenrollamiento del DNA) puede manifestarse como un cambio en el retorcimiento o en la torsión. Los cambios topológicos del número de enlace suelen estar acompañados por cambios geométricos tanto en el retorcimiento como en la torsión.

aparición de cambios estructurales en la molécula. Éstos ayudan a ilustrar los efectos del desenrollamiento. Una estructura cruciforme (véase la Fig. 8–19) suele contener un pequeño número de bases desapareadas, y el desenrollamiento del DNA permite mantener la separación de las hebras **(Fig. 24–19)**. Además, el desenrollamiento de una hélice dextrógira facilita la formación de cortas regiones de Z-DNA levógiro, allí donde la secuencia de bases lo permite (véase el Capítulo 8).

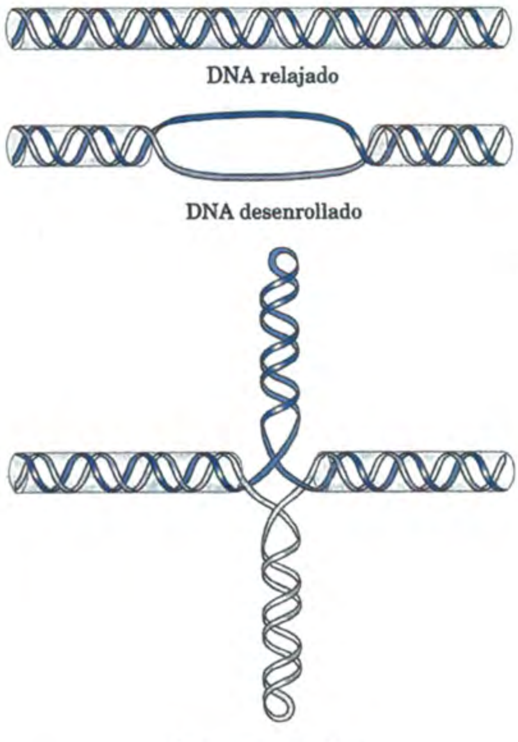


FIGURA 24–19 El desenrollamiento del DNA favorece la formación de estructuras cruciformes. En principio, las secuencias palindrómicas pueden formar estructuras cruciformes (véase la Fig. 8–19). En el DNA relajado no suelen observarse estas estructuras porque el DNA lineal contiene más bases apareadas que las estructuras cruciformes. El desenrollamiento del DNA facilita la separación parcial de las hebras, necesaria para promover la formación de estructuras cruciformes en secuencias apropiadas.

Las topoisomerasas catalizan cambios en el número de enlace del DNA

El superenrollamiento del DNA es un proceso regulado de forma precisa que tiene influencia sobre muchos aspectos del metabolismo del DNA. Todas las células tienen enzimas cuya única misión es desenrollar y/o relajar el DNA. Los enzimas que aumentan o disminuyen el grado de desenrollamiento del DNA se denominan **topoisomerasas,** y su efecto sobre el DNA es la modificación del número de enlace. Estos enzimas son muy importantes en procesos como la replicación y el empaquetamieto del DNA. Hay dos clases de topoisomerasas. Las **topoisomerasas de tipo I** realizan un corte transitorio en una de las dos hebras del DNA, hacen pasar la hebra intacta a través del corte y vuelven a unir los extremos cortados; cambian *Lk* en incrementos de 1. Las **topoisomerasas de tipo II** cortan ambas hebras y hacen variar *Lk* en incrementos de 2.

Los efectos producidos por estos enzimas pueden estudiarse mediante electroforesis en gel de agarosa **(Fig. 24–20)**. Una población de DNA plasmídicos idénticos con el mismo número

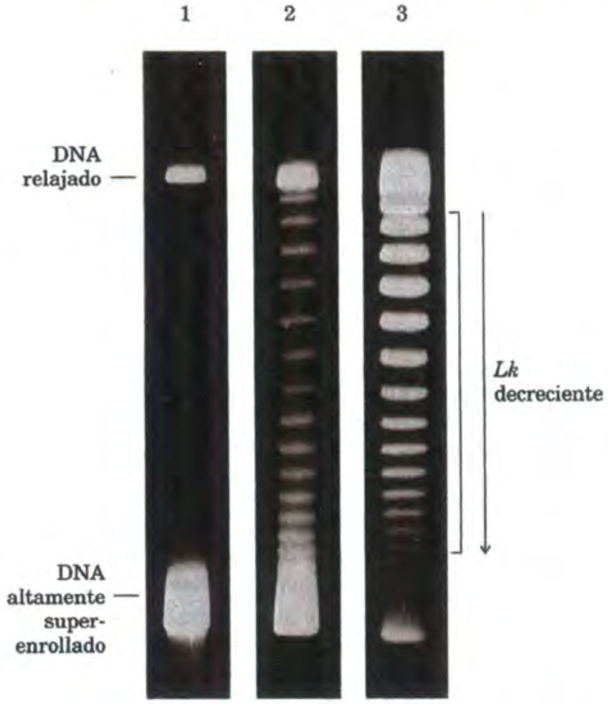


FIGURA 24–20 Visualización de los topoisómeros. En este experimento, todas las moléculas de DNA tienen el mismo número de pares de bases, pero diferente grado de superenrollamiento. Las moléculas de DNA superenrollado son más compactas que las moléculas relajadas y, por tanto, migran más rápidamente en electroforesis en gel. Los geles que aquí se muestran separan los topoisómeros (que se mueven de arriba abajo) dentro de un estrecho margen de valores de densidad superhelicoidal. En el carril 1, el DNA altamente superenrollado migra como una banda única, a pesar de que probablemente estén presentes un buen número de topoisómeros diferentes. En los carriles 2 y 3 se ilustra el efecto del tratamiento del DNA superenrollado con una topoisomerasa de tipo I; el DNA del carril 3 se trató durante más tiempo que el del carril 2. A medida que la densidad superhelicoidal disminuye van apareciendo bandas distintas, que caen dentro del intervalo en el cual el gel puede resolver topoisómeros individuales. Cada una de las bandas de la región indicada por el corchete del carril 3 tiene un número de enlace diferente; el número de enlace cambia en una unidad de una banda a la siguiente.

de enlace migra como una banda discreta durante la electroforesis. Esta técnica permite separar topoisómeros cuyos valores de *Lk* difieran en una sola unidad. Así es fácil observar los cambios en el número de enlace inducidos por las topoisomerasas.

E. coli tiene al menos cuatro topoisomerasas distintas (de la I a la IV). Las de tipo I (topoisomerasas I y III) suelen relajar el DNA eliminando superenrollamientos negativos (aumentan *Lk*). En la **Figura 24–21** se ilustra cómo las topoisomerasas de tipo I bacterianas cambian el número de enlace. Un enzima bacteriano de tipo II, denominado topoisomerasa II o DNA girasa, puede introducir superenrollamientos negativos (disminuyen *Lk*). Para ello este enzima utiliza la energía del ATP. Para alterar el número de enlace del DNA las topoisomerasas de tipo II cortan ambas hebras de la molécula de DNA y pasan otro segmento del dúplex a través del corte. La densidad superhelicoidal del DNA bacteriano se mantiene mediante la regulación de las actividades netas de las topoisomerasas I y II.

Las células eucarióticas también poseen topoisomerasas de los tipos I y II. Las topoisomerasas I y III son ambas de tipo I. El único enzima de tipo II tiene dos isoformas en los vertebrados, denominadas IIα y IIβ. La mayoría de enzimas de tipo II, incluida una DNA girasa de las arqueas, están relacionados y consti-

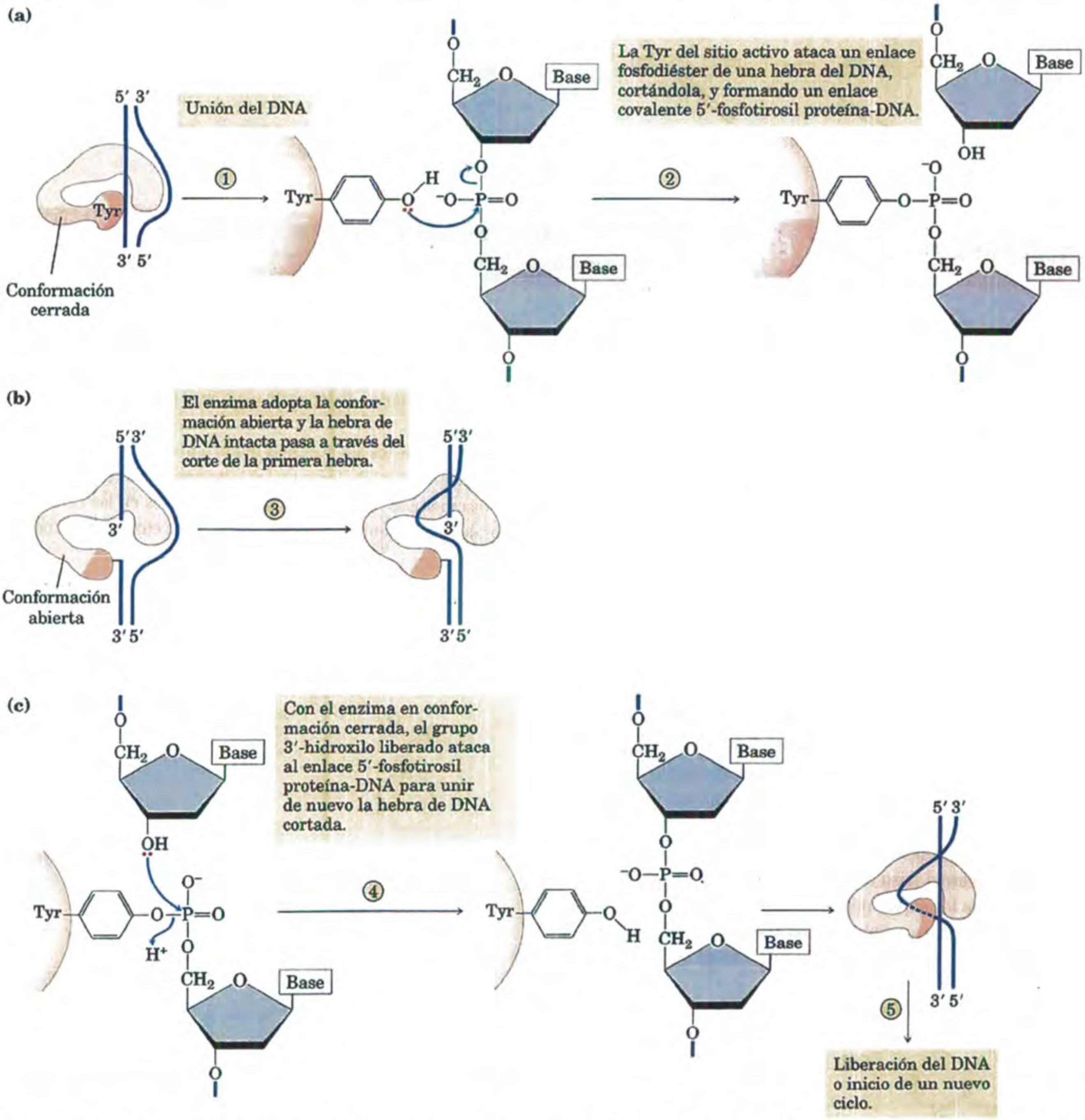
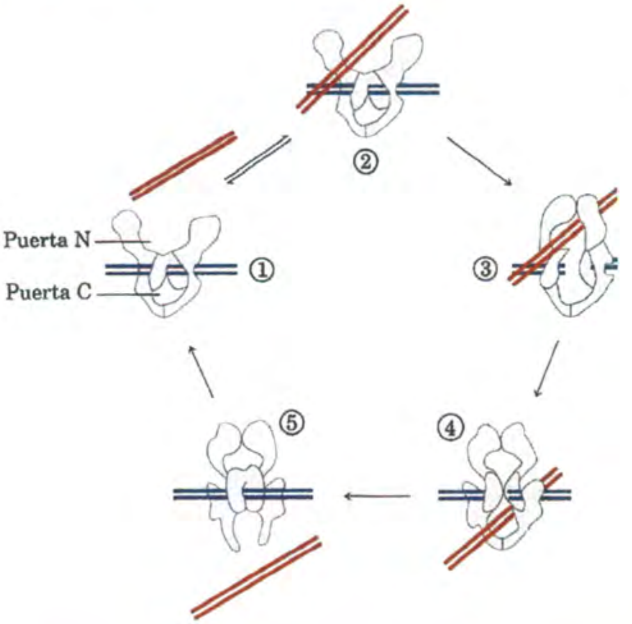


FIGURA DE MECANISMO 24–21 Las topoisomerasas bacterianas de tipo I alteran el número de enlace. Propuesta para la secuencia de reacciones de la topoisomerasa I bacteriana. El enzima tiene una conformación cerrada y otra abierta. **(a)** Una molécula de DNA se une a la conformación cerrada y se corta una hebra del DNA. **(b)** El enzima adopta la conformación abierta y la otra hebra del DNA pasa a través del corte de la primera hebra. **(c)** La continuidad de la hebra cortada se restablece con el enzima en la conformación cerrada.



tuyen una familia denominada tipo IIA. Las arqueas también tienen un enzima inusual, la topoisomerasa VI, que por sí sola define la familia IIB. Las topoisomerasas eucarióticas de tipo II no desenrollan el DNA (inducción de superenrollamiento negativo), pero son capaces de relajar tanto superenrollamientos positivos como negativos **(Fig. 24–22)**.

FIGURA 24–22 Mecanismo propuesto para la modificación del número de enlace por las topoisomerasas eucarióticas de tipo IIA. ① El enzima, formado por varias subunidades, se une a una molécula de DNA (azul). Las cavidades con puerta por encima y por debajo del DNA unido se denominan puerta N y puerta C. ② Un segundo segmento de la misma molécula de DNA (rojo) se une a la puerta N y es atrapado ③. Se cortan ahora ambas hebras del primer segmento de DNA (la química es similar a la mostrada en la Fig. 24–20b) y ④ el segundo segmento de DNA pasa a través del corte. ⑤ El DNA cortado se vuelve a unir y el segundo segmento es liberado a través de la puerta C. Durante este ciclo se unen e hidrolizan dos moléculas de ATP; es probable que una se hidrolice en el paso que genera el complejo ④. Otros detalles del componente de la hidrólisis del ATP están todavía por determinar.

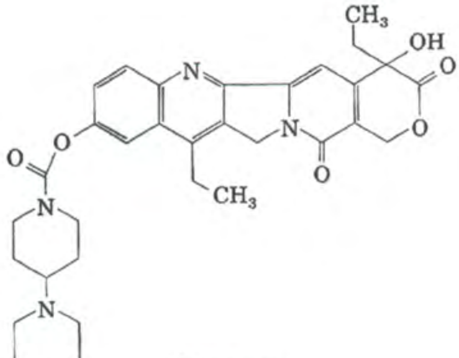
RECUADRO 24–1 MEDICINA Curación de enfermedades por inhibición de topoisomerasas

El estado topológico del DNA celular se encuentra íntimamente conectado con su función. Sin topoisomerasas, las células no pueden replicarse o empaquetar su DNA o expresar sus genes y en consecuencia mueren. Los inhibidores de la topoisomerasas se han convertido, por tanto, en importantes agentes farmacológicos para combatir agentes infecciosos o células malignas.

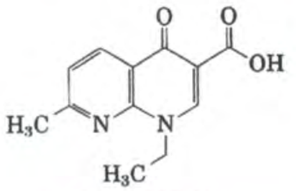
Se han desarrollado dos clases de inhibidores de las topoisomerasas bacterianas que actúan como antibióticos. Las cumarinas, novobiocina y cumermicina A1, son productos naturales derivados de especies de *Streptomyces*. Inhiben la unión del ATP a las topoisomerasas bacterianas de tipo II, DNA girasa y topoisomerasa IV. Estos antibióticos no se utilizan con frecuencia para tratar infecciones en humanos, pero continúa la investigación para identificar variantes clínicamente útiles.

Los antibióticos derivados de la quinolona, también inhibidores de la DNA girasa y de la topoisomerasa IV, hicieron su aparición en 1962 con el ácido nalidíxico. Este compuesto mostró una efectividad limitada y ya no se usa en clínica en Estados Unidos, pero el desarrollo continuado de esta clase de fármacos finalmente desembocó en la introducción de las fluoroquinolonas, como el ciprofloxacino (Cipro). La quinolonas actúan bloqueando el último paso de la reacción de la topoisomerasa, la reparación de los cortes del DNA. El ciprofloxacino es un antibiótico de espectro amplio. Es uno de los pocos antibióticos efectivos en el tratamiento de las infecciones por ántrax, y se considera un agente eficaz en la protección contra posible bioterrorismo. Las quinolonas son selectivas para las topoisomerasas bacterianas, pues inhiben los enzimas eucarióticos sólo a concentraciones varios órdenes de magnitud mayores que las dosis terapeúticas.

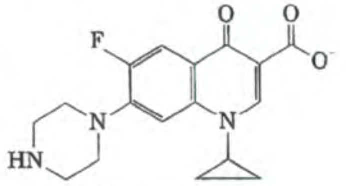
Alguno de los agentes más importantes en la quimioterapia del cáncer son inhibidores de las topoisomerasas humanas. Las topoisomerasas se hallan en elevados niveles en las células tumorales y los agentes dirigidos contra estos enzimas son más tó-



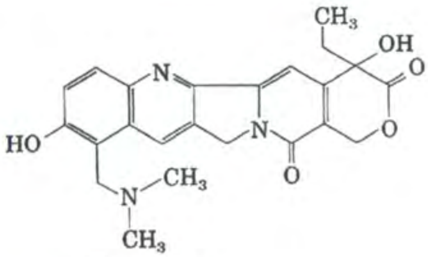
Irinotecano



Ácido nalidíxico



Ciprofloxacino



Topotecano

Como mostraremos en los siguientes capítulos, las topoisomerasas juegan un papel central en todos los aspectos del metabolismo del DNA. En consecuencia, son importantes dianas farmacológicas en el tratamiento de infecciones bacterianas y en el cáncer (Recuadro 24–1).

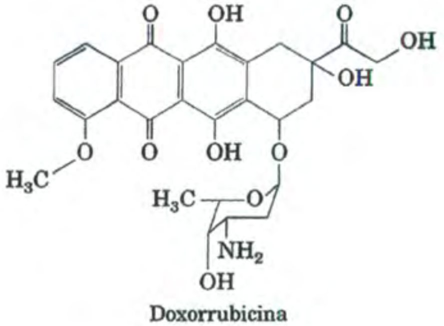
La compactación del DNA requiere una forma especial de superenrollamiento

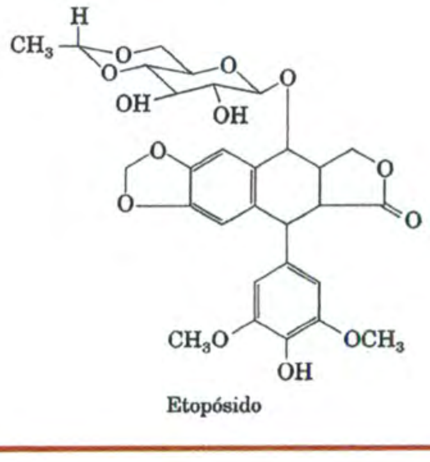
Las moléculas de DNA superenrollado son uniformes en muchos aspectos. En una molécula de DNA superenrollada negativamente (Fig. 24–17) las vueltas superhelicoidales son hacia la derecha. El DNA superenrollado tiende a adoptar una forma extendida y estrecha en lugar de compacta, y suele presentar ramificaciones múltiples **(Fig. 24–23)**. Con los valores de densidad superhelicoidal normalmente presentes en la célula, la longitud del eje de la superhélice, ramificaciones incluídas, es un 40% de la longitud del propio DNA. Este tipo de superenrollamiento se denomina **plectonémico** (del griego *plektos*, "retorcido", y *nema* "hebra"). Este término puede aplicarse a cualquier estructura cuyas hebras estén entrelazadas de forma simple y regular y describe correctamente la estructura general del DNA superenrollado en disolución.

El superenrollamiento plectonémico, la forma observada en los DNA aislados en el laboratorio, no proporciona la compactación necesaria para empaquetar el DNA en la célula. Un DNA desenrollado puede adoptar una segunda forma de superenrollamiento, denominada **solenoidal (Fig. 24–24)**. A diferencia de los superenrollamientos extendidos y hacia la derecha característicos de la forma plectonémica, el superenrollamiento solenoidal incorpora vueltas compactas hacia la izquierda. La estructura resultante es similar a la adoptada por una manguera de jardín enrollada alrededor de un soporte cilíndrico. Aunque sus estructuras son muy diferentes, los superenrollamientos plectonémico y solenoidal representan dos formas de superenrollamiento negativo que puede adoptar el *mismo* segmento de DNA desenrollado. Las dos formas pueden interconvertirse con facilidad. La forma plectonémica es más estable en

xicos para los tumores que para la mayor parte de otros tejidos. Se han desarrollado inhibidores tanto de las topoisomerasas de tipo I como de las de tipo II como fármacos anticancerosos.

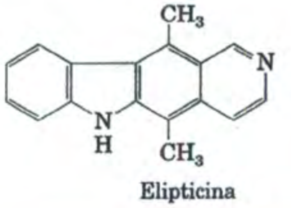
La camptotecina, aislada de un árbol ornamental de origen chino, se sometió a pruebas clínicas por primera vez en la década de 1970, en calidad de inhibidor de la topoisomerasa I. Las pruebas clínicas mostraron una eficacia limitada, a pesar de sus efectos preclínicos prometedores en ratones. No obstante, en la década de 1990 se desarrollaron dos derivados eficaces, irinotecano (Campto) y topotecano (Hycamtin), efectivos en el tratamiento del cáncer colorrectal y de ovarios, respectivamente. Otros derivados probablemente sean aprobados para uso clínico en los próximos años. Todos estos fármacos actúan bloqueando el complejo DNA-topoisomerasa en el que se corta el DNA y se inhibe el resellado.


Doxorrubicina


Etopósido

Las topoisomerasas humanas de tipo II son dianas de diversos fármacos antitumorales, entre los que se encuentran la doxorrubicina (Adriamycin), el etopósido (Etopophos) y la elipticina. La doxorrubicina, efectiva contra varios tipos de tumores humanos, es una antraciclina de uso común. La mayoría de estos fármacos estabilizan el complejo covalente topoisomerasa-DNA (cortado).

Todos estos agentes anticancerosos generalmente aumentan las lesiones en el DNA de las células diana tumorales en rápido crecimiento. Sin embargo, los tejidos no cancerosos también pueden verse afectados, apareciendo una toxicidad general y efectos secundarios desagradables que deben ser tratados adecuadamente durante la terapia. A medida que las terapias contra el cáncer se hacen más efectivas y las estadísticas de supervivencia de los pacientes de cáncer mejoran, la aparición independiente de nuevos tumores se está convirtiendo en un grave problema. En la búsqueda constante de nuevas terapias contra el cáncer, las topoisomerasas probablemente sigan siendo un importante objeto de investigación.


Elipticina

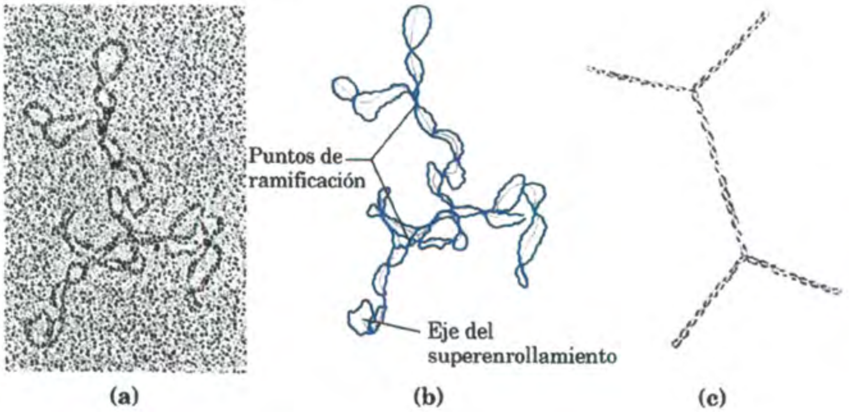


FIGURA 24–23 Superenrollamiento plectonémico. (a) Micrografía electrónica de DNA de un plásmido superenrollado plectonémicamente, junto con una interpretación de la estructura observada (b). Las líneas de color púrpura muestran el eje del superenrollamiento. Obsérvese la ramificación de la superhélice. (c) Representación idealizada de esta estructura.

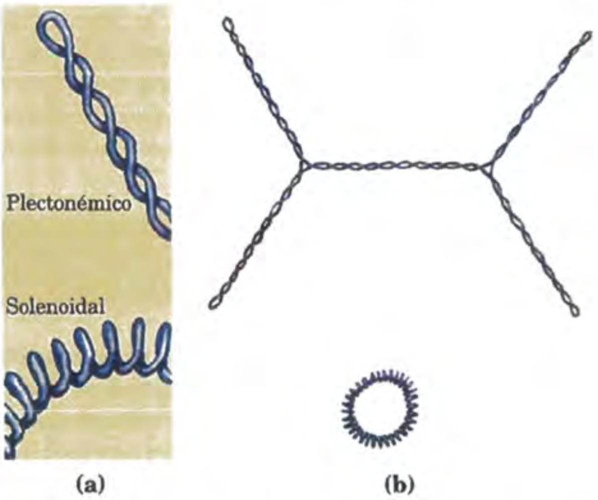


FIGURA 24–24 Formas plectonémica y solenoidal del superenrollamiento. (a) El superenrollamiento plectonémico adopta la forma de una trenza dextrógira extendida. El superenrollamiento solenoidal negativo consiste en vueltas apretadas hacia la izquierda alrededor de una estructura tubular imaginaria. Las dos formas pueden interconvertirse con facilidad, aunque la forma solenoidal no se observa normalmente a menos que se unan ciertas proteínas al DNA. (b) Superenrollamientos plectonémico (arriba) y solenoidal de la misma molécula de DNA, dibujados a escala. El superenrollamiento solenoidal produce un grado de compactación mucho mayor.

disolución, pero la forma solenoidal puede estabilizarse mediante la unión de proteínas y es la forma que se encuentra en la cromatina. Da lugar a un grado de compactación mucho mayor (Fig. 24–24b). El superenrollamiento solenoidal es el mecanismo mediante el cual el desenrollamiento contribuye a la compactación del DNA.

RESUMEN 24.2 Superenrollamiento del DNA

- La mayor parte del DNA celular está superenrollado. El desenrollamiento disminuye el número total de vueltas helicoidales del DNA en relación con la forma B relajada. Para mantener el estado desenrollado el DNA debe encontrarse en forma de círculo cerrado o bien unido a proteínas. El desenrollamiento se cuantifica mediante un parámetro topológico denominado número de enlace, *Lk*.
- El desenrollamiento se mide en términos de la diferencia de enlace específica, σ (también llamada densidad superhelicoidal), igual a $(Lk - Lk_0)/Lk_0$. Para los DNA celulares σ varía entre $-0{,}05$ y $-0{,}07$, lo que significa que entre el 5% y el 7% de las vueltas del DNA han sido eliminadas. El desenrollamiento facilita la separación de las hebras por los enzimas del metabolismo del DNA.
- Los DNA que difieren solamente en número de enlace se denominan topoisómeros. Los enzimas que desenrollan y/o relajan el DNA, las topoisomerasas, catalizan cambios de número de enlace. Las dos clases de topoisomerasas, tipo I y tipo II, cambian *Lk* en incrementos de 1 o de 2, respectivamente, por evento catalítico.

24.3 Estructura de los cromosomas

El término "cromosoma" se usa para designar la molécula de ácido nucleico que actúa como depositaria de la información genética en un virus, una bacteria, una célula eucariótica o un orgánulo. También se refiere a los cuerpos densamente coloreados que pueden observarse con el microscopio óptico en los núcleos de las células eucarióticas teñidas con colorantes.

La cromatina está compuesta de DNA y proteínas

Durante el ciclo celular (véase la Fig. 12–43) se producen grandes cambios en la estructura de los cromosomas **(Fig. 24–25)**. En las células eucarióticas que no se dividen (en G0) o en interfase (G1, S y G2), el material cromosómico, denominado **cromatina,** es amorfo y parece encontrarse disperso al azar en diversas regiones del núcleo. Durante la fase S de la interfase, el DNA en estado amorfo se replica, y cada cromosoma origina dos cromosomas hermanos (denominados cromátidas hermanas) que permanecen asociados uno con otro después de finalizada la replicación. Los cromosomas se condensan considerablemente durante la profase de la mitosis y adquieren la forma definida de los pares de cromátidas hermanas características de cada especie (Fig. 24–5).

La cromatina está formada por fibras que contienen proteínas y DNA en cantidades aproximadamente iguales (en ma-

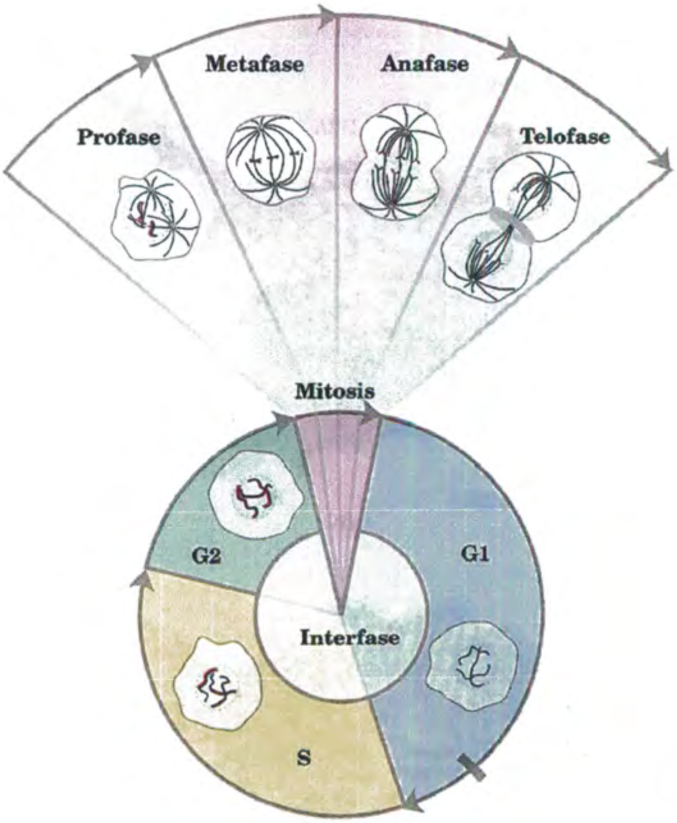


FIGURA 24–25 Cambios en la estructura de los cromosomas durante el ciclo celular eucariótico. Las longitudes relativas de las fases aquí mostradas son convencionales. La duración de cada fase varía con el tipo celular y las condiciones de crecimiento (para organismos unicelulares) o el estado metabólico (para organismos pluricelulares); la mitosis es normalmente la más corta. El DNA celular está descondensado durante la interfase, como se muestra en la representación del núcleo del diagrama. El período de la interfase puede subdividirse (véase la Fig. 12–43) en la fase G1(gap, intervalo); la fase S (síntesis), en la que se replica el DNA, y la fase G2, en la que las parejas de cromosomas replicados (cromátidas) se cohesionan. La mitosis se puede dividir en cuatro estadios. El DNA se condensa durante la profase. Durante la metafase, los cromosomas condensados se disponen por pares en el plano equidistante de los polos del huso. Un cromosoma de cada pareja está unido a cada uno de los polos del huso mediante microtúbulos que se extienden entre el huso y el centrómero. Las cromátidas hermanas se separan en la anafase, arrastradas hacia el polo del huso al cual están conectadas. El proceso se completa en la telofase. Una vez completada la división celular los cromosomas se descondensan y el ciclo comienza de nuevo.

TABLA 24–4 Tipos y propiedades de las histonas

Histona	Masa molecular	Número de residuos aminoácidos	Aminoácidos básicos (% del total) Lys	Arg
H1*	21.130	223	29,5	11,3
H2A*	13.960	129	10,9	19,3
H2B*	13.774	125	16,0	16,4
H3	15.273	135	19,6	13,3
H4	11.236	102	10,8	13,7

*El tamaño de estas histonas varía algo según la especie. Estos datos corresponden a las histonas bovinas.

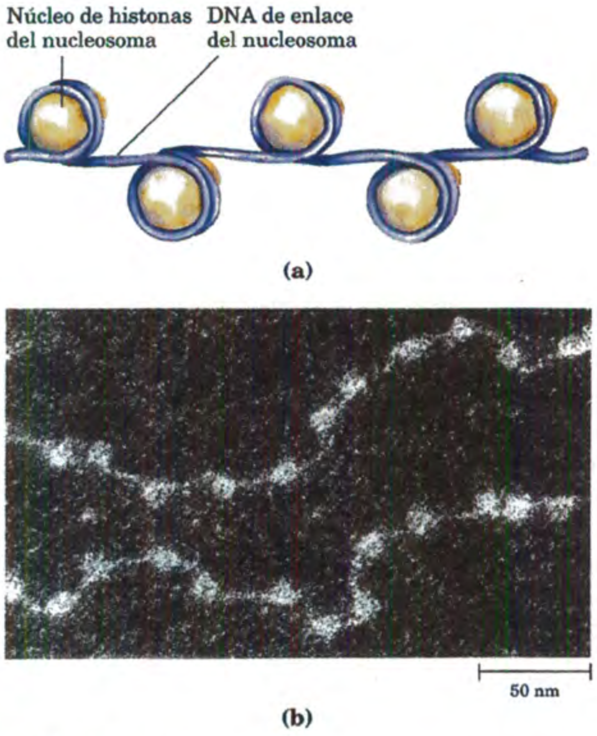


FIGURA 24–26 Nucleosomas. Los nucleosomas son complejos de histonas unidas a DNA. **(a)** Representación esquemática y **(b)** micrografía electrónica.

sa) y una pequeña cantidad de RNA. El DNA de la cromatina se encuentra íntimamente asociado con proteínas denominadas **histonas**, que empaquetan y ordenan el DNA en unidades estructurales denominadas **nucleosomas (Fig. 24–26)**. La cromatina también contiene muchas proteínas no histonas, algunas de las cuales ayudan a mantener la estructura del cromosoma y otras regulan la expresión de genes específicos (Capítulo 28). Empezando con los nucleosomas, el DNA eucariótico se empaqueta en una serie de estructuras de orden superior que culminan en el cromosoma compacto visible al microscopio óptico. Ahora nos ocuparemos de esta estructura en los eucariotas y la compararemos con el empaquetamiento del DNA en las células bacterianas.

Las histonas son pequeñas proteínas básicas

Las histonas, presentes en la cromatina de todas las células eucarióticas, tienen masas moleculares relativas que van de 11.000 a 21.000 y son muy ricas en los aminoácidos básicos arginina y lisina (que juntos suponen aproximadamente una cuarta parte de los residuos aminoácidos). Todas las células eucarióticas tienen cinco clases principales de histonas, que difieren entre sí en masa molecular y composición de aminoácidos (Tabla 24–4). Las histonas H3 tienen una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica en todos los eucariotas, al igual que las histonas H4, lo que sugiere que sus funciones se han conservado rigurosamente. Por ejemplo, hay sólo dos sustituciones aminoacídicas

entre la H4 de guisante y la de vaca, y sólo ocho sustituciones entre la H4 humana y la de levadura. Las histonas H1, H2A y H2B presentan un menor grado de similitud de secuencia entre especies eucarióticas.

Cada una de estos tipos de histona es objeto de modificaciones enzimáticas por metilación, acetilación, ADP-ribosilación, fosforilación, glucosilación, sumilación y ubiquitinación. Estas modificaciones afectan a la carga eléctrica neta, a la forma y otras propiedades de las histonas, así como a las propiedades estructurales y funcionales de la cromatina, y juegan un papel en la regulación de la transcripción.

Además, los eucariotas generalmente poseen diversas formas variantes de ciertas histonas, principalmente de las histonas H2A y H3, descritas con más detalle más adelante. Las variantes, junto con sus modificaciones, tienen funciones especializadas en el metabolismo del DNA.

Los nucleosomas son las unidades fundamentales de organización de la cromatina

El cromosoma eucariótico de la Figura 24–5 resulta de la compactación de una molécula de DNA de una longitud de unos 10^5 μm en el interior de un núcleo celular que tiene un diámetro de entre 5 y 10 μm. Esta compactación es el resultado de la superposición de varios niveles de plegamiento altamente organizado. Si se someten los cromosomas a tratamientos de desplegamiento parcial, se pueden poner de manifiesto estructuras en las que el DNA se encuentra íntimamente unido a agregados proteicos, que a menudo se hallan espaciados regularmente. Las "cuentas" de esta formación en "rosario" son ordenamientos complejos de histonas y DNA. Las cuentas y el DNA de conexión entre las cuentas forman el nucleosoma, la unidad fundamental de organización de la cromatina, a partir de la cual se organiza el empaquetamiento de orden superior **(Fig. 24–27)**. Cada nucleosoma contiene ocho moléculas de proteína, dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. El espaciado de los nucleosomas a lo largo del DNA define una unidad repetitiva de unos 200 pares de bases, de los que 146 están muy unidos alrededor del núcleo de ocho histonas y el resto sirve de nexo de unión entre los nucleosomas. La histona H1 está unida al DNA de conexión. El tratamiento corto de la cromatina con enzimas que digieren el DNA degrada preferencialmente el DNA de conexión, liberándose partículas de histona que contienen 146 pares de bases de DNA unido, que se halla protegido de la digestión. Los nucleosomas así obtenidos se han cristalizado y la difracción de rayos X ha mostrado que el nucleosoma consta de ocho moléculas de histona, sobre las cuales está enrollado el DNA, en forma de superenrollamiento solenoide levógiro (Fig. 24–27).

El examen minucioso de esta estructura permite explicar por qué el DNA eucariótico está desenrollado a pesar de que las células eucarióticas carezcan de enzimas para desenrollar el DNA. Recuérdese que el enrollamiento solenoidal del DNA en los nucleosomas es sólo una de las formas que puede adoptar el DNA desenrollado (superenrollado negativamente). El fuerte enrollamiento del DNA alrededor de los núcleos de histona en las partículas nucleosomales requiere la eliminación de una vuelta de hélice. Cuando el núcleo proteico de un nucleosoma se une in vitro a un DNA circular cerrado relajado, la unión in-

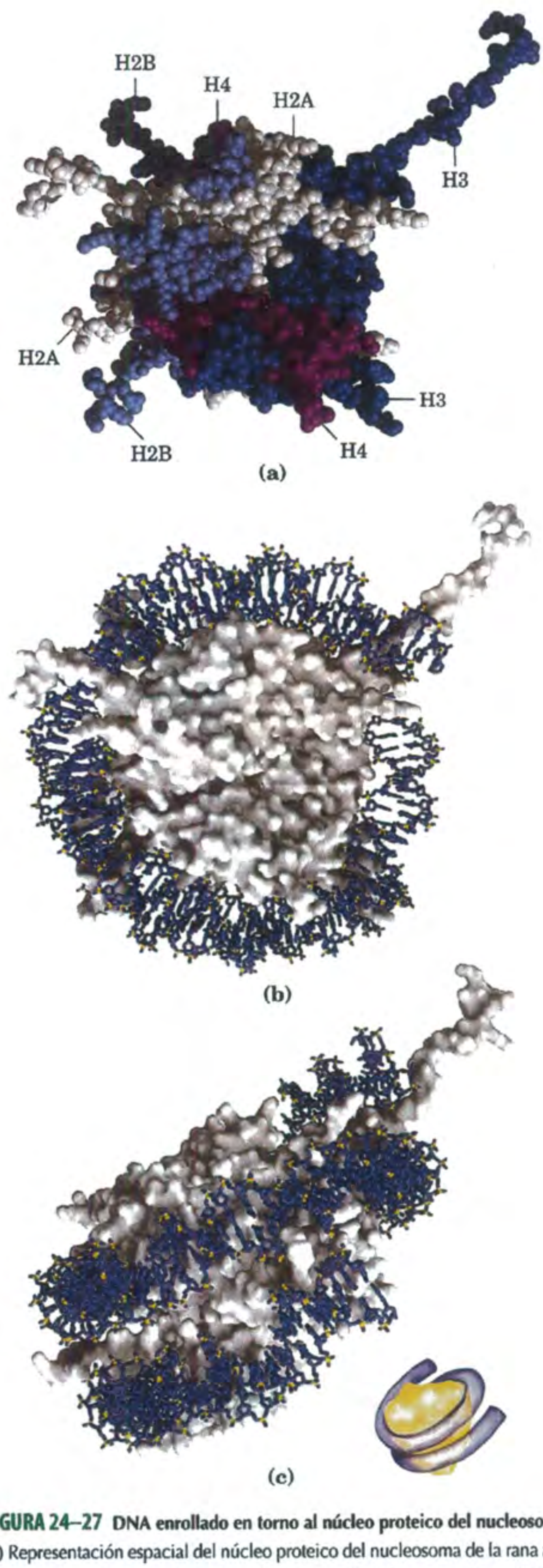


FIGURA 24–27 DNA enrollado en torno al núcleo proteico del nucleosoma. **(a)** Representación espacial del núcleo proteico del nucleosoma de la rana africana *Xenopus laevis*, con las diferentes histonas de diferentes colores (PDB ID 1AOI). Visión superior **(b)** y lateral **(c)** de la estructura cristalina del nucleosoma con 146 pares de bases de DNA. La proteína está representada por una superficie de contorno gris y el DNA en azul. El DNA se une formando un superenrollamiento solenoidal levógiro que circunda al complejo de histonas 1,8 veces. En **(c)** se muestra un dibujo esquemático que sirve de referencia para otras figuras que representan nucleosomas.

troduce un superenrollamiento negativo. Puesto que el poceso de unión no rompe el DNA ni varía el número de enlace, la formación de un superenrollamiento solenoidal negativo debe estar compensada por un superenrollamiento positivo del DNA que no se encuentra unido a proteína **(Fig. 24–28)**. Como ya se ha mencionado, las topoisomerasas eucarióticas pueden relajar superenrollamientos positivos. La relajación del superenrollamiento positivo no unido hace que el superenrollamiento negativo quede fijado (en virtud de la unión del DNA al núcleo de histonas), lo que produce un descenso neto del número de enlace. Es natural que en ensayos in vitro las topoisomerasas resulten necesarias para estructurar la cromatina a partir de histonas purificadas y DNA circular.

Otro factor que afecta la unión del DNA a las histonas en los nucleosomas es la propia secuencia del DNA. Los núcleos de histonas no se unen al azar al DNA, sino que tienden a situarse en ciertas posiciones. No se conoce con seguridad la causa del posicionamiento, pero en algunos casos parece depender de la abundancia de pares de bases A=T en los lugares de contacto de la hélice del DNA con las histonas **(Fig. 24–29)**. El íntimo enrollamiento del DNA alrededor del núcleo de histonas de los nucleosomas requiere la compresión del surco menor en estos puntos, que se ve facilitada por la presencia de dos o tres pares de bases A=T. Los nucleosomas se unen especialmente bien a secuencias en donde dinucleótidos AA, AT o TT están separados por intervalos de 10 pb. Esta disposición puede explicar hasta el 50% de las posiciones de las histonas unidas in vivo.

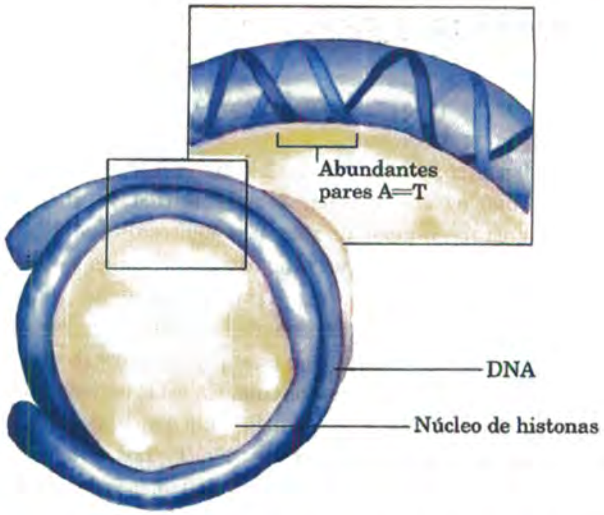


FIGURA 24–29 Posicionamiento del nucleosoma para optimizar el uso de los pares de bases A=T allí donde el núcleo de histonas está en contacto con el surco menor de la hélice de DNA.

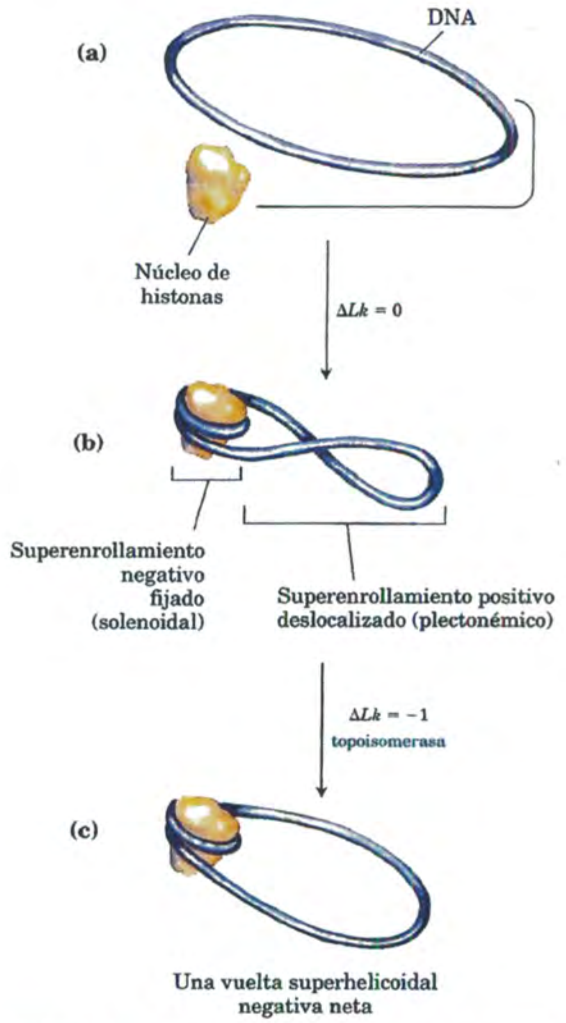


FIGURA 24–28 Ensamblaje de la cromatina. **(a)** DNA circular cerrado relajado. **(b)** La unión de un núcleo de histonas para formar un nucleosoma induce una vuelta superehelicoidal negativa. En ausencia de cortes en las cadenas, tiene que formarse una vuelta superhelicoidal positiva en algún otro lugar del DNA ($\Delta Lk = 0$). **(c)** La relajación del superenrollamiento positivo por una topoisomerasa deja una vuelta superhelicoidal negativa neta ($\Delta Lk = -1$).

Proteínas distintas de las histonas son necesarias para el posicionamiento de determinados nucleosomas en el DNA. En varios organismos ciertas proteínas se unen a secuencias específicas del DNA y así facilitan la formación de un nucleosoma en su vecindad inmediata. Los nucleosomas se depositan sobre el DNA durante la replicación o tras otros procesos que requieren el desplazamiento transitorio de los nucleosomas. La deposición se produce por etapas. Un tetrámero de dos histonas H3 y dos H4 se une primero y a continuación se depositan los dímeros de H2A–H2B. La incorporación de los nucleosomas en cromosomas después de la replicación de los cromosomas está facilitada por un complejo proteico, el factor de ensamblaje asociado a la replicación (RCAF). El RCAF está formado por las histonas H3 y H4 acetiladas, una proteína de tres subunidades conocida como factor 1 de ensamblaje de la cromatina (CAF1) y otra conocida como factor 1 de antisilenciamiento (ASF1). No se conocen los detalles del mecanismo de ensamblado de los nucleosomas, aunque se sabe que partes del complejo RCAF interaccionan directamente con partes de la maquinaria de replicación. Cuando se han de ensamblar nucleosomas después de la reparación del DNA o de otros procesos, el RCAF es reemplazado por otros complejos proteicos especializados que facilitan el ensamblado. Los factores de intercambio de histonas permiten la sustitución de variantes de las histonas en algunas circunstancias. La correcta localización de estas variantes es importante. Se ha demostrado que los ratones que carecen de una de estas variantes de histonas mueren en los primeros estadios del desarrollo embrionario (Recuadro 24–2). El posicionamiento preciso de los nucleosomas también juega un papel en la expresión de algunos genes eucarióticos (Capítulo 28).

RECUADRO 24-2 MEDICINA Epigenética, estructura nucleosómica e histonas

La información que pasa de una generación a la siguiente, a las células hijas en la división celular o de los progenitores a los descendientes pero que no está codificada en las secuencias de DNA se conoce como información **epigenética.** En su mayor parte consiste en modificaciones covalentes de las histones y/o la localización de variantes de las histones en los cromosomas.

Las regiones de la cromatina donde los genes se expresan activamente (transcripción) suelen estar parcialmente descondensadas y se denominan **eucromatina.** En estas regiones, en lugar de las histones H3 y H2A se encuentran a menudo las variantes H3.3 y H2AZ, respectivamente (Fig. 1). Los complejos que depositan nucleosomas en el DNA con variantes de las histonas son similares a los que depositan nucleosomas con las histonas más comunes. Los nucleosomas que contienen la histona H3.3 son depositados por un complejo en el cual el factor 1 de ensamblaje de la cromatina (CAF1) ha sido reemplazado por la proteína HIRA (el nombre deriva de la clase de proteínas denominadas HIR, *h*istone *r*epressor, por represor de histonas). CAF1 y HIRA pueden considerarse como chaperonas de histones, que ayudan al correcto ensamblaje y colocación de los nucleosomas. La secuencia de la H3.3 difiere de la H3 en sólo cuatro residuos aminoácidos, pero todos estos residuos tienen papeles determinantes en la descarga de las histonas.

Al igual que la histona H3.3, la H2AZ está asociada a un complejo de descarga de nucleosomas específico, y generalmente se encuentra en regiones de la cromatina con transcripción activa. La incorporación de H2AZ estabiliza el octámero del nucleosoma, pero impide ciertas interacciones cooperativas entre los nucleosomas, que son necesarias para compactar el cromosoma. Ello tiene como resultado una estructura cromosómica más abierta que facilita la expresión de los genes en las regiones donde se encuentra la H2AZ. El gen que codifica la H2AZ es esencial para los mamíferos. En la mosca de la fruta, la pérdida de H2AZ impide el desarrollo más allá de los estadios larvales.

Otra variante de la H2A es la H2AX, que se asocia con la reparación del DNA y la recombinación genética. En los ratones, la ausencia de H2AX provoca inestabilidad genómica e infertilidad en los machos. La H2AX se encuentra dispersa en pequeñas cantidades por todo el genoma. Cuando se produce un corte de las dos cadenas del DNA, las moléculas cercanas de H2AX son fosforiladas en la Ser^{139} en la región carboxi-terminal. Si se bloquea experimentalmente esta fosforilación no se forman los complejos proteicos necesarios para la reparación del DNA.

La variante de la H3 denominada CENPA se asocia al DNA repetitivo de los centrómeros. La cromatina centromérica contiene las chaperonas de histonas CAF1 e HIRA; ambas podrían estar implicadas en la formación de nucleosomas que contengan CENPA. La eliminación del gen de CENPA es letal para los ratones.

La función y el posicionamiento de las variantes de las histonas pueden estudiarse con las técnicas de la genómica. Una técnica muy útil es la inmunoprecipitación de cromatina, o IP de cromatina (ChIP). Los nucleosomas que contienen una determinada variante de histona son precipitados con un anticuerpo que se una específicamente a esta variante. Estos nucleosomas pueden estudiarse aislados de su DNA, pero en general el DNA con ellos asociado se incluye en el estudio para determinar dón-

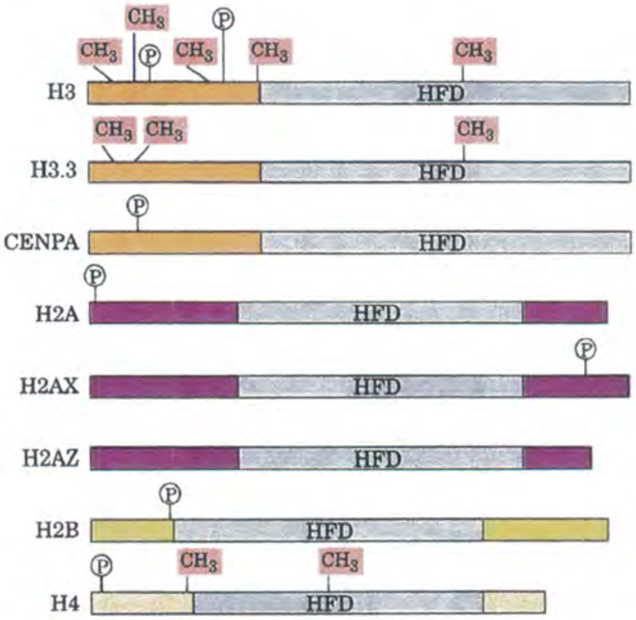


FIGURA 1 Se conocen varias variantes de las histones H3, H2A y H2B. Se muestran la histones internas y unas pocas de sus variantes conocidas. Se indican los sitios de metilación de residuos Lys/Arg y de fosforilación de Ser. HFD indica el dominio con el plegamiento de histona, un motivo estructural compartido por todas las histonas internas.

Los nucleosomas se empaquetan en sucesivos órdenes superiores de organización

El enrollamiento del DNA alrededor del núcleo proteico del nucleosoma hace que la longitud del DNA se compacte unas siete veces. Pero el grado de compactación final del cromosoma es de unas 10.000 veces, lo cual muestra la existencia de órdenes superiores de organización estructural. En los cromosomas aislados con métodos muy suaves, los nucleosomas aparecen organizados en una estructura denominada **fibra de 30 nm (Fig. 24–30)**. Este nivel de empaquetamiento requiere una molécula de histona H1 por nucleosoma. La organización en fibras de 30 nm no abarca todo el cromosoma, sino que se encuentra interrumpida por regiones unidas a proteínas (no histonas), que interaccionan con el DNA con especificidad de secuencia. La presencia de fibras de 30 nm en una determinada región depende también de la actividad transcripcional del DNA. Las regiones con genes que están siendo transcritos se hallan aparentemente en un estado menos ordenado y contienen poca o ninguna histona H1.

de se unen los nucleosomas de interés. El DNA puede marcarse y usarse para examinar una micromatriz (microarray) (véase la Fig. 9–22) para obtener un mapa de las secuencias genómicas a las que están unidos estos nucleosomas. Puesto que las micromatrices a menudo se denominan chips, esta técnica recibe el nombre de ChIP–chip (Fig. 2).

Las variantes de las histonas, junto con las muchas modificaciones covalentes que éstas pueden presentar, contribuyen a definir y a delimitar las funciones de la cromatina. Señalizan la cromatina, al facilitar o suprimir funciones específicas tales como la segregación de los cromosomas, la transcripción y la reparación del DNA. Las modificaciones de las histonas no desaparecen en la división celular o durante la meiosis y por lo tanto forman parte de la información transmitida de una generación a la siguiente en todos los organismos eucarióticos.

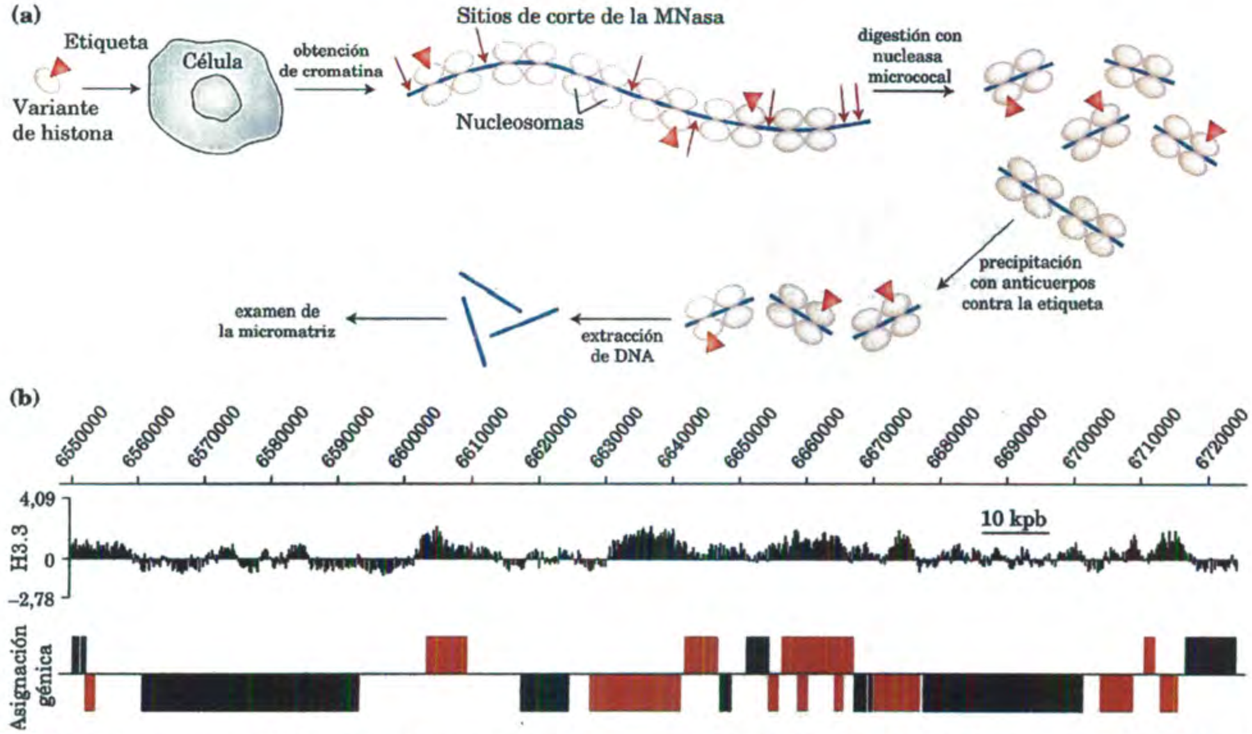
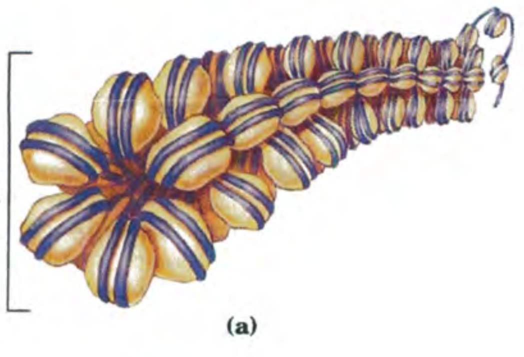


FIGURA 2 Diseño de un experimento de ChIP–chip para determinar las secuencias de DNA genómico a las que se une una variante de histona. **(a)** Una variante de histona con un epitopo que hace las veces de etiqueta (una proteína o estructura química reconocida por un anticuerpo; véanse los Capítulos 5 y 9) se introduce en un tipo celular determinado, donde se incorpora a los nucleosomas. (En algunos casos la etiqueta es innecesaria, pues se dispone de anticuerpos que se unen a la modificación de la histona estudiada.) Se aísla cromatina de las células y se digiere brevemente con nucleasa micrococal (MNasa). El DNA unido a los nucleosomas se encuentra protegido frente a la digestión, pero el DNA internucleosomal es cortado, obteniéndose fragmentos de DNA unidos a uno o dos nucleosomas. Se añade anticuerpo para precipitar selectivamente la variante de histona etiquetada con el epitopo. Se extrae el DNA de los nucleosomas del precipitado, se marca y se utiliza para examinar una micromatriz que contenga parte o la totalidad de secuencias genómicas de este tipo celular particular. **(b)** El patrón de hibridación en la micromatriz pone de manifiesto las secuencias de DNA donde se unen los nucleosomas con la variante de histona estudiada. En este ejemplo (panel superior) se muestran los patrones de hibridación para el DNA al que se une la histona H3.3 en un pequeño segmento del genoma de *Drosophila*. La asignación génica en este segmento del genoma se muestra en el panel inferior (barras gruesas). La unión de la histona H3.3 se concentra en y cerca de los genes activamente transcritos (barras rojas).



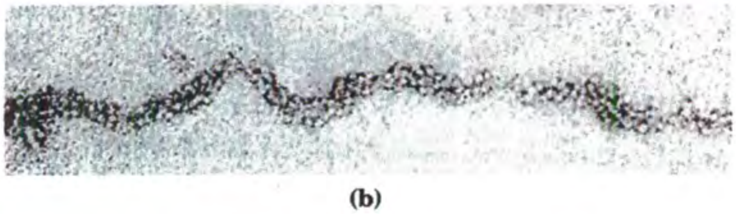


FIGURA 24–30 Una estructura de orden superior de los nucleosomas, la fibra de 30 nm. **(a)** Ilustración esquemática de la probable estructura de la fibra que muestra el empaquetamiento de los nucleosomas. **(b)** Micrografía electrónica.

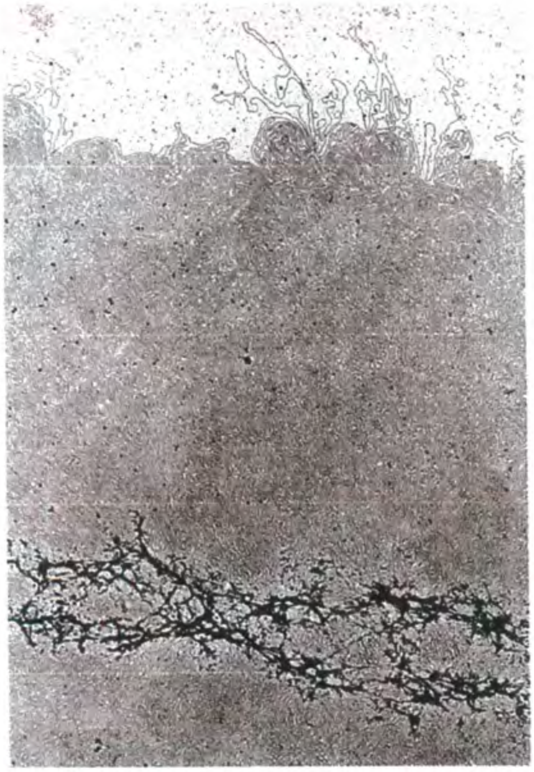


FIGURA 24–31 Cromosoma humano parcialmente desplegado, con numerosos bucles de DNA unidos a una estructura parecida a un armazón.

El segundo nivel de organización de la cromatina, la fibra de 30 nm, da lugar a una compactación del DNA de unas 100 veces. Los siguientes niveles de plegamiento no se conocen todavía con exactitud, pero parece ser que ciertas regiones del DNA se asocian a un armazón nuclear **(Fig. 24–31)**. Las regiones asociadas al armazón están separadas por bucles de DNA de entre 20 y 100 kpb. El DNA de estos bucles podría contener un conjunto de genes relacionados. En *Drosophila*, por ejemplo, conjuntos completos de genes que codifican las histonas parecen estar agrupados en bucles que se mantienen unidos al armazón por sitios de fijación **(Fig. 24–32)**. El propio armazón puede contener varias proteínas, sobre todo histona H1 (localizada en el interior de la fibra) y topoisomerasa II. La presencia de la topoisomerasa II resalta todavía más la relación entre el desenrollamiento del DNA y la estructura de la cromatina. La topoisomerasa II es tan importante en el mantenimiento de la estructura de la cromatina que los inhibidores de este enzima pueden tener un efecto letal sobre células en rápida división. Varios fármacos utilizados en la quimioterapia del cáncer son inhibidores de la topoisomerasa II, que no interfieren en la rotura de las hebras del DNA pero impiden su posterior unión.

Existen niveles adicionales de organización en los cromosomas eucarióticos, cada uno con efectos multiplicativos sobre el grado de compactación. En la **Figura 24–33** se muestra un modelo que ilustra cómo conseguir esta compactación. La es-

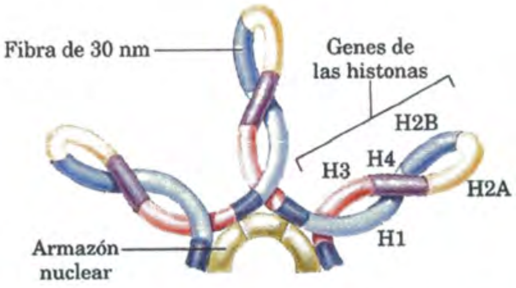


FIGURA 24–32 Lazos de DNA cromosómico unidos a un armazón nuclear. El DNA de los bucles está empaquetado en fibras de 30 nm; por tanto, los bucles representan el siguiente nivel de organización. Los bucles suelen contener grupos de genes con funciones relacionadas. Conjuntos completos de genes de histonas, como se muestra en este esquema, parecen estar agrupados en estos lazos. A diferencia de la mayoría de genes, los genes de histonas están presentes en copias múltiples en el genoma de muchos eucariotas.

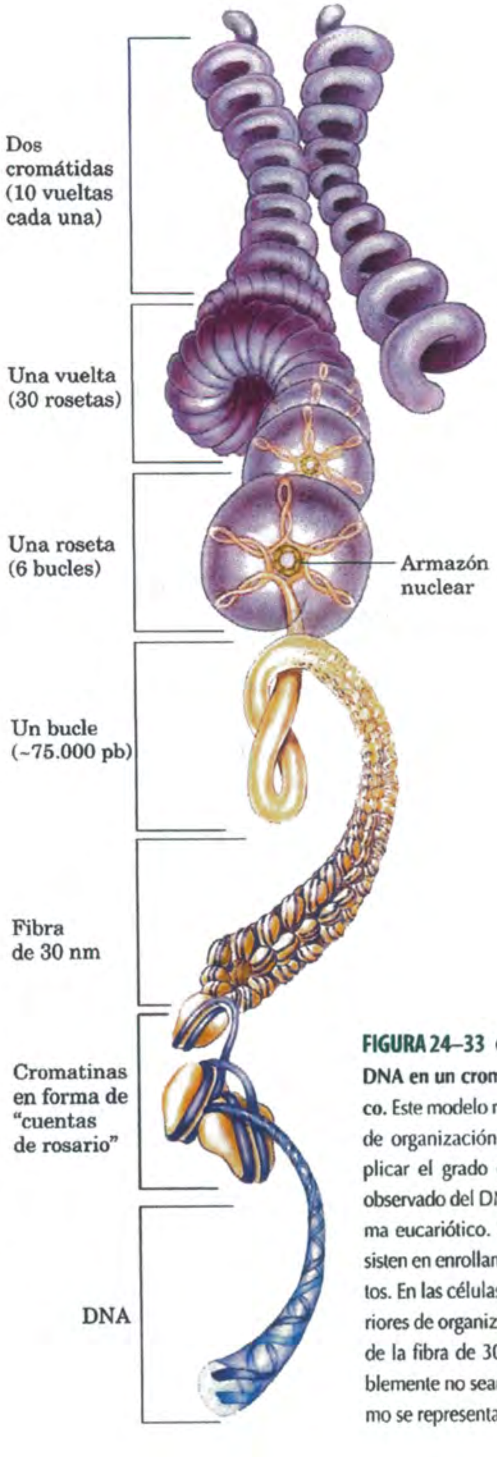


FIGURA 24–33 Compactación del DNA en un cromosoma eucariótico. Este modelo muestra los niveles de organización que podrían explicar el grado de compactación observado del DNA en el cromosoma eucariótico. Estos niveles consisten en enrollamientos superpuestos. En las células, los niveles superiores de organización (por encima de la fibra de 30 nm) muy probablemente no sean tan regulares como se representa en la figura.

tructura de orden superior de la cromatina varía probablemente de un cromosoma a otro, de una región a otra en un cromosoma determinado y según el momento del ciclo celular. Un solo modelo no puede describir adecuadamente esta variedad de estructuras. Sin embargo, el principio es simple: la compactación del DNA en los cromosomas eucarióticos probablemente se base en una serie de enrollamientos superpuestos... **Empaquetamiento tridimensional de los cromosomas nucleares**

Las estructuras de los cromosomas condensados se mantienen mediante proteínas SMC

Una tercera clase de proteínas importantes de la cromatina, además de las histonas y las topoisomerasas, son las **proteínas SMC** (*s*tructural *m*aintenance of *c*hromosomes, mantenimiento estructural de los cromosomas). La estructura primaria de las proteínas SMC consta de cinco dominios diferentes (**Figura 24–34a**). Los dominios globulares amino- y carboxi-terminales, N y C, contribuyen cada uno con una parte de un sitio para la hidrólisis de ATP y están conectadas por dos regiones en hélice α espiraladas una en torno de la otra (véase la Fig. 4–10), unidas por un dominio bisagra. Estas proteínas son generalmente diméricas y forman un complejo en forma de V, que posiblemente se mantiene unido a través de los dominios bisagra (Fig. 24–34b). Un dominio N y un dominio C se unen para formar un sitio de hidrólisis de ATP completo en cada extremo de la V.

Proteínas pertenecientes a la familia SMC se encuentran en todos los tipos de organismos, de las bacterias a los humanos. Los eucariotas tienen dos tipos principales, las cohesinas y las condensinas, a las que se unen proteínas reguladoras y accesorias (Fig. 24–34d).

Las **cohesinas** juegan un importante papel en la unión de las cromátidas hermanas inmediatamente después de la replicación y las mantienen juntas cuando los cromosomas se condensan en la metafase. Esta asociación es esencial para la correcta segregación de los cromosomas en la división celular. Se cree que las cohesinas, junto con una tercera proteína, la kleisina, forman un anillo alrededor de los cromosomas replicados que los unen entre sí hasta que la división celular requiere su separación. El anillo se puede expandir y contraer en respuesta a la hidrólisis de ATP (Fig. 24–34e). Las **condensinas** son esenciales para la condensación de los cromosomas en la entrada de las células en la mitosis. En el laboratorio, las condensinas se unen al DNA de modo que forman vueltas superhelicoidales positivas; es decir, la unión de las condensinas provoca un enrollamiento adicional del DNA, al contrario de los nucleosomas, que lo desenrollan. No está claro cómo este efecto puede ayudar a la condensación de la cromatina. Sin embargo, es posible que el enrollamiento del DNA alrededor de la condensina participe en la condensación del DNA. La cohesinas y las condensinas son esenciales en la coordinación de los numerosos cambios en la estructura de los cromosomas durante el ciclo celular eucariótico (**Fig. 24–35**).

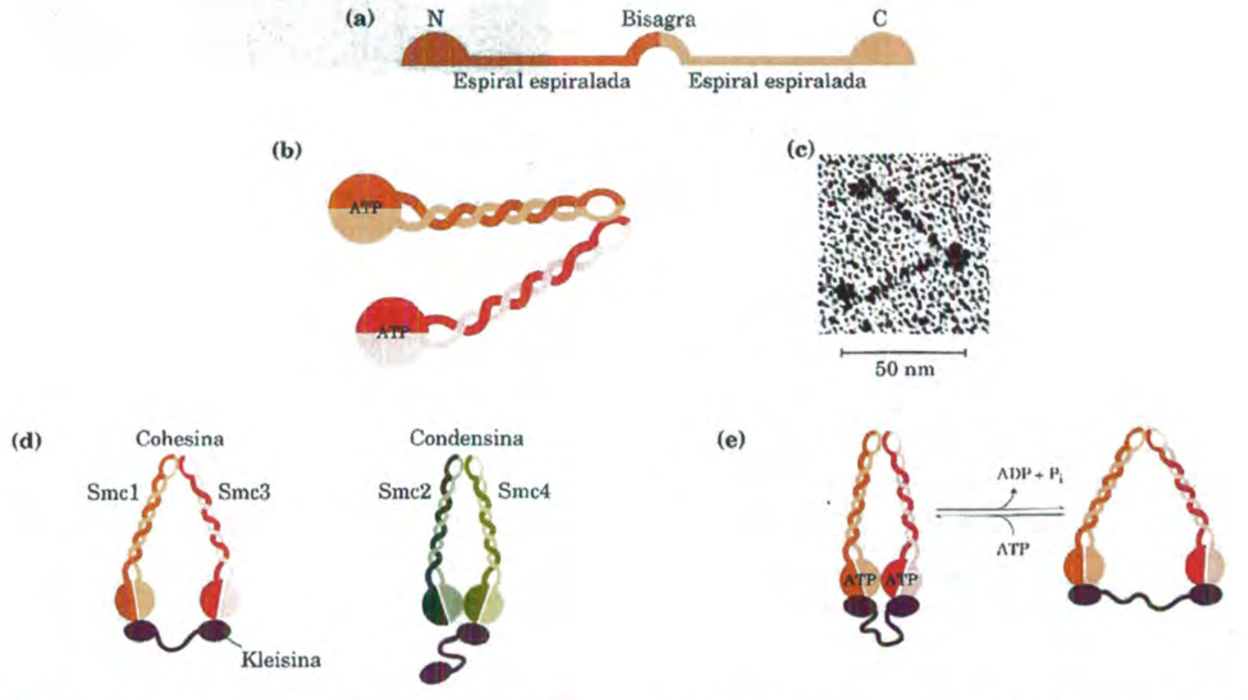


FIGURA 24–34 Estructura de las proteínas SMC. **(a)** Los cinco dominios de la estructura primaria de las SMC. N y C designan los dominios amino-terminal y carboxi-terminal, respectivamente. **(b)** Cada polipéptido se pliega de manera que los dos dominios de espiral espiralada se enrollan uno en torno a otro y los dominios N y C se juntan para formar un sitio completo de unión de ATP. Dos polipéptidos se unen por la región bisagra par formar una molécula SMC dimérica en forma de V. **(c)** Micrografía electrónica de las proteínas SMC de *Bacillus subtilis*. **(d)** Las cohesinas están formadas por parejas de proteínas Smc1 y Smc3 y las condensinas consisten en parejas Smc2-Smc4. La kleisina y otras proteínas reguladoras adicionales (no mostradas) se unen a estas proteínas SMC eucarióticas. **(e)** La hidrólisis del ATP puede servir para abrir y cerrar los extremos del dominio ATPasa del dímero de proteínas SMC, que permanecen unidas por kleisina (y otras proteínas no mostradas).

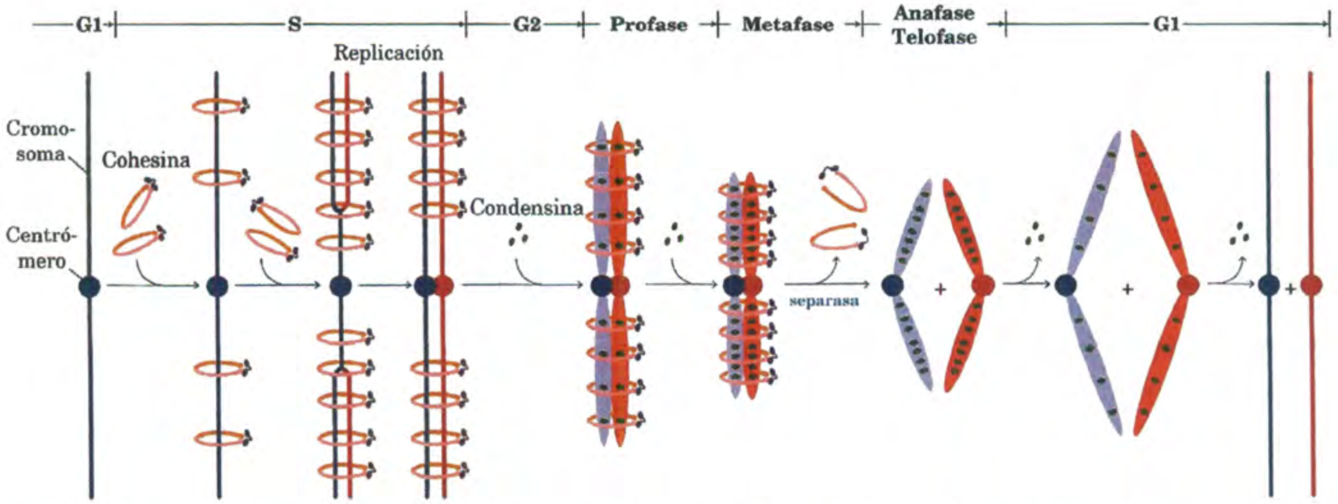


FIGURA 24–35 Modelo del efecto de las cohesinas y las condensinas durante el ciclo celular eucariótico. Las cohesinas se incorporan a los cromosomas durante la fase G1, manteniendo las cromátidas hermanas unidas durante la replicación. Las condensinas se unen al inicio de la mitosis y mantienen las cromátidas en un estado condensado. Durante la anafase, una actividad denominada separasa elimina los enlaces de cohesina. Una vez separadas las cromátidas, las condensinas empiezan a abandonar los cromosomas y los cromosomas hijos vuelven a un estado descondensado.

El DNA bacteriano también se encuentra altamente organizado

Comentaremos brevemente la estructura del cromosoma bacteriano. El DNA bacteriano se compacta formando una estructura llamada **nucleoide,** que ocupa una parte significativa del volumen celular **(Fig. 24–36)**. El DNA está unido por uno o más puntos a la superficie interior de la membrana plasmática. Se conoce mucho menos acerca de la estructura del nucleoide que de la cromatina eucariótica, pero poco a poco se van conociendo los detalles de una compleja organización. En *E. coli* hay una estructura parecida a un armazón que organiza el cromosoma *circular* en una serie de unos 500 dominios en bucle, cada uno de unos 10.000 pb **(Fig. 24–37)**, similares a los descritos anteriormente para la cromatina. Los dominios están fijados topológicamente; por ejemplo, si el DNA se corta en un dominio sólo se relajará el DNA de este dominio. Los dominios no tienen extremos fijos, sino que probablemente sus límites se encuentran en constante movimiento a lo largo del DNA, coordinados con la replicación del DNA. No parece que la organización local producida por los nucleosomas en los eucariotas tenga parangón en el DNA bacteriano. En *E. coli* abundan las proteínas similares a las histonas; el ejemplo mejor caracterizado es una proteína de dos subunidades denominada HU (M_r 19.000). Sin embargo, estas proteínas se unen y se disocian en pocos minutos y no se ha encontrado ninguna estructura DNA-histona estable y regular. Los cambios estructurales dinámicos del cromosoma bacteriano reflejan posiblemente la necesidad de un acceso más rápido a la información genética que contiene. El ciclo de división de la célula bacteriana puede durar tan sólo 15 min, mientras que una célula eucariótica típica puede permanecer sin dividirse durante horas o incluso meses. Además, una fracción mucho mayor del DNA bacteriano codifica proteínas o RNA y las elevadas tasas del metabolismo celular de las bacterias indican que en un determinado momento se está transcribiendo o replicando una mayor proporción de DNA que en la mayoría de células eucarióticas.

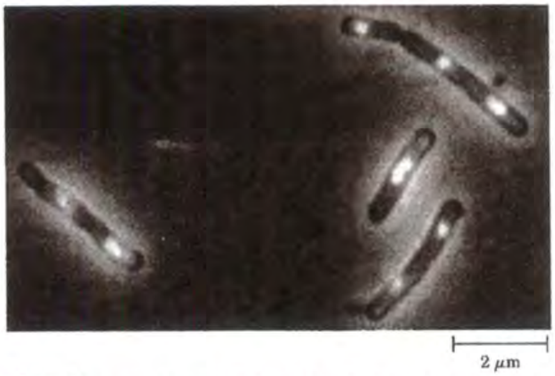


FIGURA 24–36 Nucleoides de células de *E. coli*. El DNA de estas células está teñido con un colorante que emite fluorescencia cuando es expuesto a luz UV. El área clara corresponde al nucleoide. Obsérvese que algunas células han replicado su DNA sin haberse producido todavía la división celular, y por ello presentan múltiples nucleoides.

FIGURA 24–37 Dominios en forma de lazo del cromosoma de *E. coli*. Cada dominio tiene unos 10.000 pb de longitud. Los dominios no son estáticos, sino que se mueven a lo largo del DNA a medida que avanza la replicación. Barreras de composición desconocida en los límites de los dominios impiden la relajación del DNA más allá de los límites del dominio donde se haya producido el corte de una hebra del DNA. Los supuestos complejos en los límites de los dominios están representados por ovoides grises. Las flechas indican el movimiento del DNA a través de los complejos.

Después de esta visión general de la complejidad de la estructura del DNA, nos encontramos en disposición de abordar su metabolismo en el capítulo siguiente.

RESUMEN 24.3 Estructura de los cromosomas

- La unidad fundamental de organización de la cromatina de las células eucarióticas es el nucleosoma, formado por histonas y un segmento de DNA de 200 pb. Un núcleo proteico con ocho histonas (dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) está rodeado por un segmento de DNA (de unos 146 pb) en forma de superhélice solenoidal levógira.
- Los nucleosomas forman fibras de 30 nm que se pliegan de manera compacta para alcanzar la relación de empaquetamiento de 10.000 veces, necesaria para alojar un cromosoma eucariótico típico en el núcleo celular. El plegamiento de orden superior requiere la unión a un armazón nuclear que contiene histona H1, topoisomerasa II y proteínas SMC. Las proteínas SMC, principalmente cohesinas y condensinas, tienen un importante papel en el mantenimiento de la organización cromosómica durante todas las etapas del ciclo celular.
- Los cromosomas bacterianos también están densamente compactados en el nucleoide, pero el cromosoma parece poseer una estructura mucho más dinámica e irregular que la cromatina eucariótica, de acuerdo con un ciclo celular más corto y el muy activo metabolismo de las células bacterianas.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

cromosoma 947
fenotipo 947
mutación 947
gen 948
secuencia reguladora 948
plásmido 949
intrón 952
exón 952
DNA de secuencia simple 953
DNA satélite 953
centrómero 953
telómero 953
superenrollamiento del DNA 954
DNA relajado 954
topología 955
desenrollamiento 955
número de enlace 956
diferencia de enlace específica (σ) 957
densidad superhelicoidal 957
topoisómeros 957
torsión 957
retorcimiento 957
topoisomerasas 958
plectonémico 961
solenoidal 961
cromatina 962
histonas 963
nucleosoma 963
epigenética 966
eucromatina 966
fibra de 30 nm 966
proteínas SMC 969
cohesinas 969
condensinas 969
nucleoide 970

Bibliografía

General

Blattner, F.R., Plunkett, G. III, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453–1474.
Nuevos datos sobre *Escherichia coli*, este organismo de laboratorio común.

Cozzarelli, N.R. & Wang, J.C. (eds). (1990) *DNA Topology and Its Biological Effects*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Kornberg, A. & Baker, T.A. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, W. H. Freeman & Company, New York.
Adecuado para ampliar conocimientos sobre la estructura y la función del DNA.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Plough, H., & Matsudaira, P. (2008) *Molecular Cell Biology*, 6th edn, W. H. Freeman & Company, New York.
Otra excelente referencia general.

Genes y cromosomas

Bromham, L. (2002) The human zoo: endogenous retroviruses in the human genome. *Trends Ecol. Evol.* **17**, 91–97.
Descripción detallada de una de las clases de transposones que forman una gran parte del genoma humano.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563–567.
Primera secuencia completa del genoma de un eucariota, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Long, M., de Souza, S.J., & Gilbert, W. (1995) Evolution of the intron-exon structure of eukaryotic genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 774–778.

McEachern, M.J., Krauskopf, A., & Blackburn, E.H. (2000) Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 331–358.

Schmid, C.W. (1996) Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **53**, 283–319.

Tyler-Smith, C. & Floridia, G. (2000) Many paths to the top of the mountain: diverse evolutionary solutions to centromere structure. *Cell* **102**, 5–8.
Análisis de la diversidad de estructuras de los centrómeros de diversos organismos tal como se conocen actualmente.

Vega, L.R., Mateyak, M.K., & Zakian, V.A. (2003) Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 948–959.

Superenrollamiento y topoisomerasas

Berger, J.M. (1998) Type II DNA topoisomerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 26–32.

Boles, T.C., White, J.H., & Cozzarelli, N.R. (1990) Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **213**, 931–951.
Estudio que define varias características fundamentales del DNA superespiralado.

Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369–413.
Excelente resumen de las diversas clases de topoisomerasas que existen.

Garcia H.G., Grayson, P., Han, L., Inamdar, M., Kondev, J., Nelson, P.C., Phillips, R., Widom, W., & Wiggins, P.A. (2007) Biological consequences of tightly bent DNA: the other life of a macromolecular celebrity. *Biopolymers* **85**, 115–130.
Una buena descripción de la física del DNA curvado.

Lebowitz, J. (1990) Through the looking glass: the discovery of supercoiled DNA. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 202–207.

Breve e interesante nota histórica.

Pommier, Y. (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 789–802.

Wang, J.C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 430–440.

Cromatina y nucleosomas

Kornberg, R.D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868–871.

Artículo clásico que propuso la estructura en subunidades de la cromatina.

Losada, A. & Hirano, T. (2005) Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* **19**, 1269–1287.

Nasmyth, K. & Haering, C.H. (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 595–648.

Rando, O.J. (2007) Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet.* **23**, 67–73.

Descripción de los imaginativos métodos utilizados en el estudio de los patrones de modificación de los nucleosomas, el posicionamiento de los nucleosomas y otros aspectos de la estructura de los cromosomas a escala genómica.

Sarma, K. & Reinberg, D. (2005) Histone variants meet their match. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 139–149.

Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thåström, A., Field, Y., Moore, I.K., Wang, J.Z., & Widom, J. (2006) A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* **442**, 772–778.

Thanbichler, M., Wang, S.C., & Shapiro, L. (2005) The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *J. Cell. Biochem.* **96**, 506–521.

Wyman, C. & Kanaar, R. (2002) Chromosome organization: reaching out to embrace new models. *Curr. Biol.* **12**, R446–R448.

Bueno y breve resumen de la estructura de los cromosomas y del papel que en ella juegan las proteínas SMC.

Problemas

1. Empaquetamiento del DNA en un virus El DNA del bacteriófago T2 tiene una masa molecular de 120×10^6, encerrado en una cabeza de unos 210 nm de longitud. Suponiendo que la masa molecular de un par de nucleótidos es de 650, calcule la longitud del DNA y compárela con la longitud de la cabeza del fago T2.

2. El DNA del fago M13 El DNA del bacteriófago M13 tiene la siguiente composición de bases: A, 23%; T, 36%, G, 21%; C, 20%. ¿Qué nos dicen estos datos acerca de su DNA?

3. El genoma de *Mycoplasma* El genoma completo de la bacteria más simple conocida, *Mycoplasma genitalium*, es una molécula de DNA circular de 580.070 pb. Calcule la masa molecular y la longitud de contorno de la molécula relajada. ¿Cuál es el valor de Lk_0 del cromosoma de *Mycoplasma*? Si $\sigma = -0{,}06$ ¿cuál es el valor de Lk?

4. El tamaño de los genes eucarióticos Un enzima aislado de hígado de rata tiene 192 residuos aminoácidos y está codificado por un gen de 1.440 pb. Explique la relación existente entre el número de residuos aminoácidos del enzima y el número de pares de nucleótidos del gen.

5. El número de enlace Una molécula de DNA circular cerrado tiene un Lk de 500 en forma relajada. ¿Cuál es el número aproximado de pares de bases de este DNA? ¿Cómo se altera el número de enlace (aumenta, disminuye, no varía, no está definido) cuando: (a) se une a un complejo proteico para formar un nucleosoma; (b) se corta una de las hebras del DNA; (c) se añaden DNA girasa y ATP a la disolución de DNA; (d) se desnaturaliza la doble hélice mediante calor?

6. Topología del DNA En presencia de una condensina eucariótica y una topoisomerasa de tipo II, el Lk de una molécula de DNA circular cerrada y relajada no cambia. Sin embargo, el DNA resulta densamente anudado.

La formación de nudos requiere la rotura del DNA, el paso de un segmento de DNA a través de la rotura y la religación por la topoisomerasa. Dado que se esperaría que la acción de la topoisomerasa resultase en un cambio del número de enlace, ¿cómo puede Lk mantenerse constante?

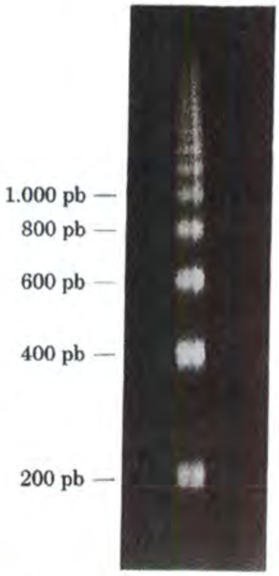
7. Densidad superhelicoidal El bacteriófago λ infecta *E. coli* integrando su DNA en el cromosoma bacteriano. El éxito de esta recombinación depende de la topología del DNA de *E. coli*. Cuando la densidad superhelicoidal (σ) del DNA de *E. coli* es superior a $-0{,}045$, la probabilidad de integración es <20%; cuando σ es inferior a -0,06 la probabilidad es >70%. Un DNA plasmídico aislado de un cultivo de *E. coli* tiene 13.800 pares de bases y un Lk de 1.222. Calcule el valor de σ de este DNA y pronostique la probabilidad de que el bacteriófago λ pueda infectar este cultivo.

8. Modificación del número de enlace (a) ¿Cuál es el Lk de una molécula de DNA circular de doble cadena de 5.000 pb con un corte en una de las cadenas? (b) ¿Cuál es el Lk de la molécula (a) cuando se cierra el corte(relajada)? (c) ¿Cómo se modificaría el Lk de la molécula en (b) por acción de una única molécula de topoisomerasa I de *E. coli*? (d) ¿Cuál es el Lk de la molécula en (b) después de ocho ciclos enzimáticos de una sola molécula de DNA girasa en presencia de ATP? (e) ¿Cuál es el Lk de la molécula (d) después de cuatro ciclos enzimáticos de una sola molécula de topoisomerasa I bacteriana? (f) ¿Cuál es el Lk de la molécula en (d) después de la unión de un nucleosoma?

9. Cromatina Uno de los primeros experimentos que ayudaron a definir la estructura del nucleosoma se muestra en el gel de agarosa ilustrado en la primera columna de la página siguiente, en el que las bandas gruesas representan al DNA. Este resultado se obtuvo tratando brevemente la cromatina con un enzima que degrada el DNA, eliminando a continuación las proteínas y analizando el DNA purificado por electroforesis. Los números a un lado del gel muestran la posición en la que migraría un DNA lineal del tamaño indicado. ¿Qué nos dice este gel sobre la estructura de la cromatina? ¿Cuál es la razón de que las bandas sean gruesas y difusas en lugar de estar bien definidas?

10. Estructura del DNA Explique de qué modo el subenrollamiento de la hélice del B-DNA puede facilitar o estabilizar la formación de Z-DNA.

11. Estabilidad de la estructura del DNA (a) Describa dos características estructurales necesarias para que una molécula de DNA mantenga la forma negativamente espiralada. (b) Enu-



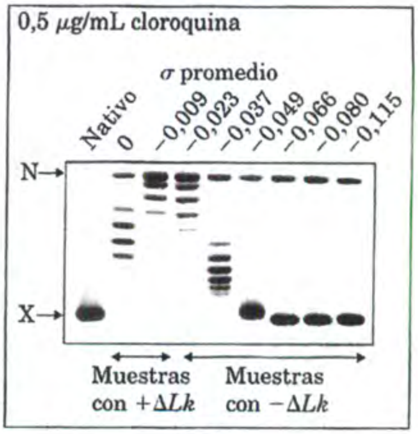
mere tres cambios estructurales que son más favorables cuando la molécula está superespiralada negativamente. (c) ¿Qué enzima, con ayuda de ATP, puede generar superhelicidad negativa en el DNA? (d) Describa el mecanismo físico de acción del enzima.

12. Cromosomas artificiales de levadura (YAC) Los YAC son usados para el clonaje de trozos grandes de DNA en células de levadura. ¿Qué tres tipos de secuencias de DNA son necesarios para asegurar la correcta replicación y propagación de un YAC en una célula de levadura?

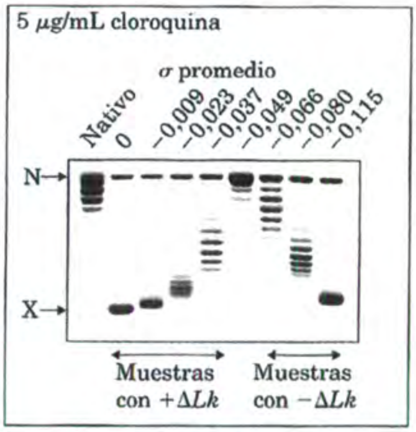
13. La estructura del nucleoide de las bacterias En las bacterias, la transcripción de una parte de sus genes se ve afectada por la topología del DNA. La transcripción aumenta o (más a menudo) disminuye cuando el DNA está relajado. Cuando un cromosoma bacteriano es cortado en un sitio específico por un enzima de restricción (una que corta una secuencia larga, y por lo tanto escasa), solo los genes cercanos (dentro de 10.000 pb) muestran un aumento o una disminución de la expresión. La transcripción de los genes en otros lugares del cromosoma no se ve afectada. Encuentre una explicación (Pista: Observe la Fig. 24–37).

14. Topoisómeros del DNA Cuando el DNA se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa, las moléculas más cortas migran más deprisa que las largas. El DNA circular cerrado del mismo tamaño, pero de diferente número de enlace, también puede separarse en gel de agarosa: los topoisómeros más super-espiralados, y por tanto más condensados, migran más deprisa a través del gel; de arriba abajo en los geles mostrados a la derecha. Los geles contienen un colorante, cloroquina. La cloroquina se intercala entre pares de bases y estabiliza una estructura del DNA más desenrollada. Cuando el colorante se une a un DNA circular cerrado relajado, el DNA se desenrolla en el lugar de unión del colorante y las regiones no unidas adquieren vueltas superhelicoidales positivas en compensación. En el experimento que se muestra aquí, se utilizaron topoisomerasas para obtener preparaciones del mismo círculo de DNA con diferentes densidades superhelicoidales (σ). El DNA completamente relajado migró a la posición N (DNA mellado) y el DNA altamente superespiralado (por encima del límite para distinguir los topoisómeros individuales) a la posición marcada con una X.

(a) En el gel A, ¿por qué el carril correspondiente a $\sigma = 0$ (es decir, DNA preparado para que como promedio $\sigma = 0$) tiene múltiples bandas?



Gel A



Gel B

(b) En el gel B, ¿el DNA de la preparación $\sigma = 0$ se encuentra positiva o negativamente espiralado en presencia del colorante intercalado?

(c) En ambos geles, el carril correspondiente a $\sigma = -0{,}115$ tiene dos bandas, una de DNA altamente superespiralado y otra de DNA relajado. Proponga una explicación para la presencia de DNA relajado en estos (y otros) carriles.

(d) El DNA nativo (el carril más a la izquierda en cada gel) es el mismo DNA circular aislado de las bacterias y no sometido a ningún tratamiento. ¿Cuál es la densidad superhelicoidal aproximada de este DNA nativo?

Problema de análisis de datos

15. Determinación de los elementos funcionales de los cromosomas de levadura La Figura 24–9 muestra los elementos estructurales principales de un cromosoma de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*). Heiter, Mann, Snyder y Davies (1985) determinaron las propiedades de alguno de estos elementos. Basaron su estudio en el hallazgo que en las células de levadura los plásmidos (que tienen genes y un origen de replicación) se comportan de forma distinta que los cromosomas (que además de estos elementos poseen centrómeros y telómeros) durante la mitosis. Los plásmidos no son considerados por el aparato mitótico y se segregan al azar entre las células hijas. En ausencia de un marcador seleccionable que fuerce las células huésped a retenerlos (véase la Fig. 9–4), los plásmidos se pierden rápidamente. Por el contrario, los cromosomas, incluso sin un marcador seleccionable, son manipulados por el aparato mitótico y se pierden muy lentamente (alrededor de 10^{-5} por división celular).

Nunca he topado con un enzima aburrido.

—*Arthur Kornberg, en el ensayo "For Love of Enzymes," 1975*

25

Metabolismo del DNA

Como depositario de la información genética, el DNA ocupa un lugar central y único entre las macromoléculas biológicas. Las secuencias de nucleótidos del DNA codifican la estructura primaria de todos los RNA y proteínas celulares y, a través de los enzimas, puede influir indirectamente en la síntesis del resto de constituyentes celulares. Este paso de información del DNA al RNA y a la proteína determina el tamaño, la forma y la función de todos los seres vivos.

El DNA es un ingenio maravilloso para el almacenamiento estable de la información genética. La expresión "almacenamiento estable" da una imagen estática y engañosa ya que no evoca la complejidad de los procesos implicados en el mantenimiento de la integridad del mensaje genético y su transmisión de una generación de células a la siguiente. El metabolismo del DNA comprende el proceso mediante el cual se hacen copias fieles de las moléculas de DNA (replicación), junto a los procesos que afectan la estructura inherente de la información (reparación y recombinación). El conjunto de estas actividades constituye el objeto de este capítulo.

Las características del metabolismo del DNA están determinadas por la necesidad de un alto grado de precisión. La química de la unión de un nucleótido al siguiente en la replicación del DNA es sumamente elegante y simple, casi de manera engañosa. Pero, tal como veremos, la complejidad aparece en forma de recursos enzimáticos en la síntesis de las macromoléculas que contienen información intervienen sistemas complejos que aseguran que la información sea transmitida con fidelidad. En la síntesis del DNA, los errores no corregidos pueden tener funestas consecuencias, no sólo porque pueden afectar permanentemente o eliminar la función de un gen, sino también porque el cambio es hereditario.

Los enzimas que sintetizan DNA tienen que copiar moléculas que contienen a menudo millones de bases. Lo hacen con extraordinaria fidelidad y velocidad, a pesar de que el sustrato DNA está muy compactado y unido a otras proteínas. La síntesis de los enlaces fosfodiéster para unir nucleótidos en el armazón de una cadena de DNA en crecimiento es, por tanto, solamente una parte de un elaborado sistema en el que intervienen multitud de proteínas y enzimas.

La reparación del DNA tiene como objetivo mantener la integridad de la información genética. Tal como se detalla en el Capítulo 8, el DNA puede ser objeto de muchos tipos de reacciones que pueden dañarlo. Estas reacciones son infrecuentes, pero no obstante son importantes debido a la muy baja tolerancia biológica a los cambios en la secuencia del DNA. El DNA es la única molécula que dispone de mecanismos de reparación; su número, diversidad y complejidad reflejan la amplia gama de agresiones que pueden afectar al DNA.

Las células pueden reordenar su información genética mediante procesos colectivamente designados por recombinación, en aparente contradicción con el principio según el cual la estabilidad e integridad de la información genética son prioritarias. Sin embargo, la mayoría de reordenamientos del DNA contribuyen al mantenimiento de la integridad del genoma en la replicación, la reparación del DNA y la segregación de los cromosomas.

En este capítulo se concede una especial atención a los *enzimas* del metabolismo del DNA. Merecen un estudio cuidadoso tanto por su importancia biológica e interés intrínsecos como por su comportamiento cada vez mayor en medicina y por su uso habitual en las modernas tecnologías bioquímicas. Muchos de los descubrimientos más importantes sobre el metabolismo del DNA se han hecho en *Escherichia coli*; por ello algunos de sus enzimas mejor conocidos son usados para ilustrar los principios básicos. Una rápida ojeada a los genes importantes en el mapa genético de *E. coli* (**Fig. 25–1**) da sólo una somera idea de la complejidad de los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo del DNA.

Antes de pasar al estudio detallado de la replicación, hemos de hacer una breve disgresión sobre el empleo de las abreviaturas en la nomenclatura de genes y proteínas, de uso frecuente en éste y otros capítulos. Hay convenciones similares para los genes eucarióticos, aunque la forma exacta de las abreviaciones puede variar con la especie, pues no hay reglas aceptadas para todos los sistemas eucarióticos.

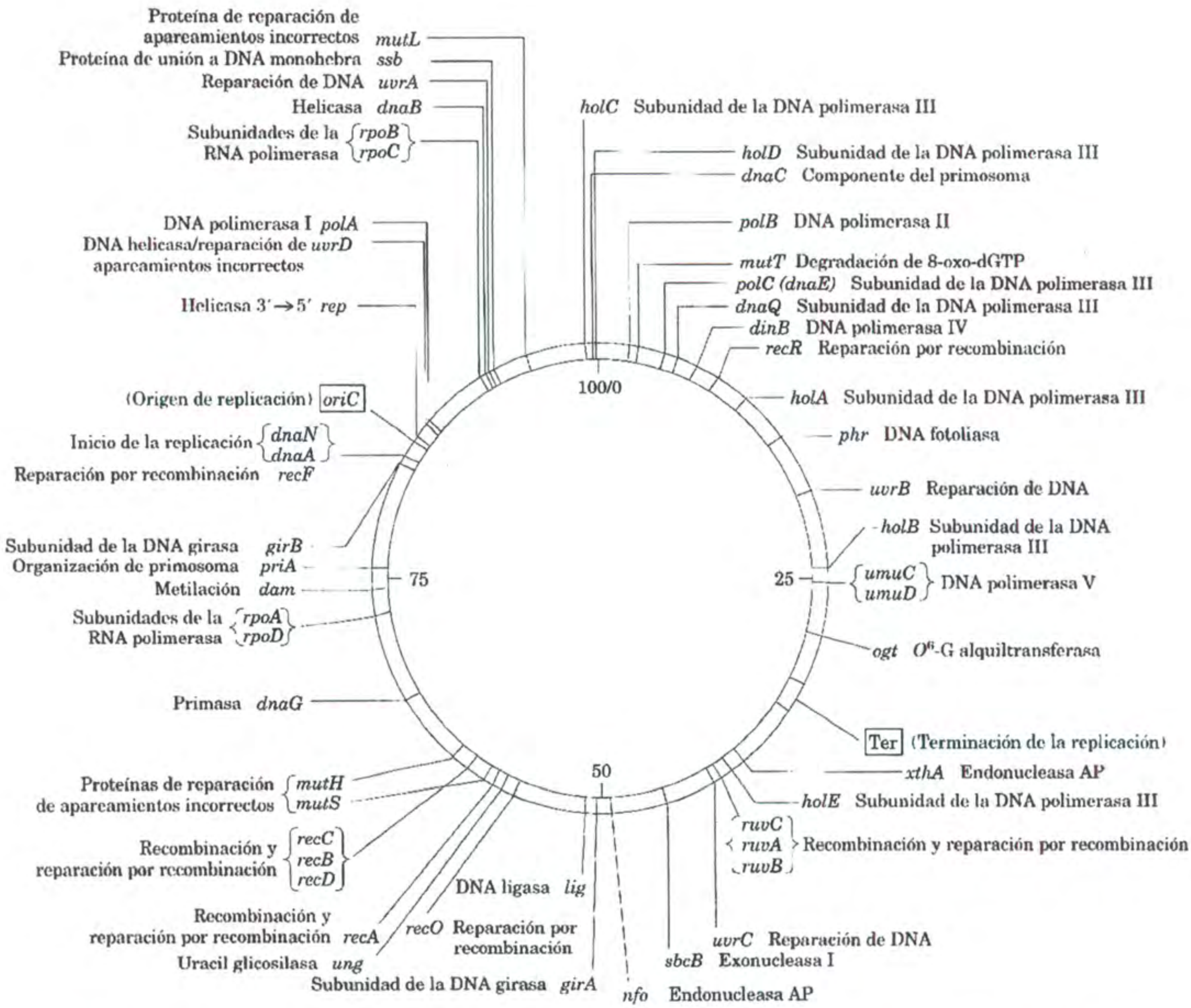


FIGURA 25–1 Mapa del cromosoma de *E. coli*. El mapa muestra las posiciones relativas de los genes que codifican muchas de las proteínas importantes en el metabolismo del DNA. El número de genes implicados conocidos da una idea de la complejidad de estos procesos. Los números de 0 a 100 en el interior del cromosoma circular indican una medida genética denominada minutos. Cada minuto corresponde a unos 40.000 pb a lo largo de la molécula de DNA de *E. coli*. Los nombres de tres letras de los genes y otros elementos reflejan generalmente algún aspecto de su función. Entre ellos se cuentan *mut*, mutagénesis; *dna*, replicación del DNA; *pol*, DNA polimerasa; *rpo*, RNA polimerasa; *uvr*, resistencia a UV; *rec*, recombinación; *dam*, metilación de la adenina del DNA; *lig*, DNA ligasa; *Ter*, terminación de la replicación; y *ori*, origen de la replicación (*oriC* en *E. coli*, tal como se muestra aquí).

CONVENCIÓN CLAVE: Los genes bacterianos se nombran generalmente con tres letras minúsculas en cursiva, que a menudo hacen referencia a su función aparente. Por ejemplo, los genes *dna*, *uvr* y *rec* están implicados en la replicación del *DNA*, la resistencia a los efectos dañinos de la radiación *UV* y la *recombinación*, respectivamente. Cuando varios genes afectan al mismo proceso, se añaden las letras *A*, *B*, *C*, etc., como en *dnaA*, *dnaB*, *dnaQ*, por ejemplo, que generalmente reflejan el orden en que han sido descubiertos, en lugar de la posición en una secuencia de reacciones. ■

El uso de abreviaturas para nombrar proteínas no es tan sencillo. En el curso de las investigaciones genéticas, a menudo se acaba aislando y caracterizando la proteína producto de cada gen. Muchos genes bacterianos han sido identificados y nombrados antes de que las funciones de sus productos proteicos fuesen comprendidas en detalle. A veces, el producto génico resulta ser una proteína previamente aislada y es necesario un cambio de nombre. A menudo, sin embargo, el producto proteico es totalmente nuevo, con una actividad que no es fácilmente descrita por un nombre enzimático sencillo.

CONVENCIÓN CLAVE: Las proteínas bacterianas a menudo conservan el nombre de sus genes. Para designar el producto proteico de un gen de *E. coli* se utilizan caracteres redondos y la primera letra se escribe en mayúscula: por ejemplo, los productos de los genes *dnaA* y *recA* se denominan proteínas DnaA y RecA, respectivamente. ■

25.1 Replicación del DNA

Mucho antes de que se conociese la estructura del DNA, los científicos ya se habían maravillado sobre la capacidad de los organismos para crear copias fieles de sí mismos y, más tarde, sobre la capacidad de las células para producir muchas copias idénticas de macromoléculas grandes y complejas. La reflexión sobre estos problemas se centró en el concepto de **molde,** una estructura que haría posible alinear las moléculas en un orden específico y luego unirlas para crear una macromolécula con una estructura y una función únicas. En la década de 1940 se descubrió que el DNA era la molécula encargada de almacenar la información genética, pero no fue hasta que James Watson y Francis Crick dedujeron su estructura que resultó evidente de qué forma el DNA actuaba de molde para la replicación y la transmisión de la información genética: *cada una de las cadenas es complementaria de la otra*. Las estrictas reglas del apareamiento de bases obligan a que cada cadena haga de molde para una nueva cadena, cuya secuencia es totalmente predecible y complementaria (véanse las Figs. 8–14 y 8–15).

Los nucleótidos: bloques de construcción de los ácidos nucleicos

Las propiedades fundamentales de la replicación del DNA y de los mecanismos utilizados por los enzimas que la catalizan han resultado ser básicamente idénticos en todos los organismos. Esta unidad mecánica será un tema fundamental cuando pasemos de las propiedades generales del proceso de replicación a los enzimas que lo catalizan en *E. coli* y, finalmente, en los eucariotas.

La replicación del DNA está gobernada por un conjunto de reglas fundamentales

Los primeros estudios sobre la replicación del DNA bacteriano y sus enzimas contribuyeron al establecimiento de varias propiedades básicas que han resultado ser aplicables a la síntesis del DNA de todos los organismos.

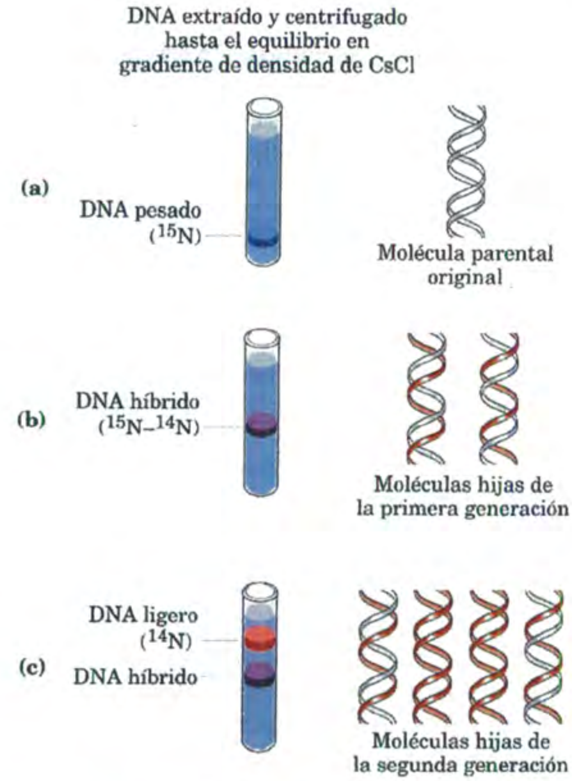


FIGURA 25–2 Experimento de Meselson-Stahl. (a) Se cultivaron células durante muchas generaciones en un medio que contenía sólo nitrógeno pesado, ^{15}N, de modo que todo el nitrógeno en el DNA era ^{15}N, tal como muestra la presencia de una única banda (azul) cuando el DNA fue centrifugado en un gradiente de densidad de CsCl. **(b)** A continuación se transfirieron las células a un medio que sólo contenía nitrógeno ligero, ^{14}N. El DNA celular aislado después de la primera generación alcanzó el equilibrio en una posición superior del gradiente de CsCl (banda púrpura). **(c)** Un segundo ciclo de replicación produjo una banda de DNA híbrido (púrpura) y una segunda banda (roja), que solamente contenía [^{14}N]DNA, confirmándose así que la replicación era semiconservadora.

La replicación del DNA es semiconservadora Cada cadena del DNA actúa de molde para la síntesis de una nueva cadena. El resultado son dos moléculas de DNA nuevas, cada una con una cadena nueva y otra vieja. Este proceso se denomina **replicación semiconservadora.**

La hipótesis de la replicación semiconservadora fue propuesta por Watson y Crick poco después de la publicación de su artículo sobre la estructura del DNA en 1953; esta hipótesis fue confirmada en 1957 mediante ingeniosos experimentos diseñados por Matthew Meselson y Franklin Stahl. Estos investigadores cultivaron células de *E. coli* durante varias generaciones en un medio cuya única fuente de nitrógeno (NH_4Cl) contenía ^{15}N, el isótopo "pesado" del nitrógeno, en lugar del isótopo "ligero" normal y más abundante, el ^{14}N. El DNA aislado de estas células tenía una densidad un 1% mayor que el [^{14}N]DNA normal **(Fig. 25–2a)**. Aunque la diferencia es pequeña, es posible separar la mezcla de [^{15}N]DNA pesado y [^{14}N]DNA ligero por equilibrio de sedimentación en gradiente de densidad de cloruro de cesio.

Las células de *E. coli* cultivadas en medio con ^{15}N se transfirieron a un medio que contenía solamente el isótopo ^{14}N, donde se las dejó crecer justo hasta la duplicación de la población celular. El DNA aislado de esta primera generación de células formó una *única* banda en el gradiente de CsCl en una posición que indicaba que los DNA de doble hélice de las células hijas eran híbridos que contenían una cadena nueva con ^{14}N y una cadena parental con ^{15}N (Fig. 25–2b).

Este resultado contradecía la replicación conservadora, una hipótesis alternativa según la cual una molécula de DNA de la progenie estaría formada por dos cadenas de DNA recién sintetizadas, mientras que la otra contendría las dos cadenas parentales; este mecanismo no produciría moléculas de DNA híbridas en el experimento de Meselson y Stahl. La hipótesis de la replicación semiconservadora se confirmó durante la siguiente etapa del experimento (Fig. 25–2c). Se permitió que las células volviesen a doblar su número en el medio con ^{14}N. El DNA aislado de este segundo ciclo de replicación mostró *dos* bandas en el gradiente de densidad, una que presentaba una densidad igual a la del DNA ligero y una segunda que tenía la densidad del DNA híbrido observada después de la primera duplicación celular.

La replicación empieza en un lugar de origen y normalmente avanza de forma bidireccional Confirmado el mecanismo semiconservador de la replicación, se plantearon un buen número de preguntas. ¿Se desenrollan totalmente las cadenas de DNA parental antes que cada una sea replicada? ¿Empieza la replicación en sitios al azar o en un único punto? Después de iniciada la replicación en un punto del DNA, ¿transcurre en una dirección o en ambas?

Las primeras indicaciones de que la replicación era un proceso altamente coordinado, en el que las cadenas parentales se desenrollaban y replicaban simultáneamente, fueron obtenidas por John Cairns mediante autorradiografía. Cairns incorporó radiactividad en el DNA de *E. coli*, cultivando las células en un medio que contenía timidina marcada con tritio (^{3}H). El DNA, cuidadosamente aislado y extendido, fue cubierto con una emulsión fotográfica durante varias semanas. La desintegración del ^{3}H de la timidina impresionó los granos de plata de la emulsión, formando una imagen de la molécula de DNA. Estas imágenes mostraron que el cromosoma intacto de *E. coli* es un gran círculo único de 1,7 mm de longitud. El DNA radiactivo aislado de células en proceso de replicación mostraba un lazo extra **(Fig. 25–3a)**. Cairns llegó a la conclusión de que el lazo en el DNA era el resultado de la formación de dos cadenas hijas radiactivas, cada una complementaria de una cadena parental. Uno o ambos extremos del lazo son puntos dinámicos llamados **horquillas de replicación,** donde el DNA parental es desenrollado y las cadenas separadas rápidamente replicadas. Los resultados de Cairns demostraron que las dos cadenas del DNA se replican simultáneamente. Una variante de este experimento (Fig. 25–3b) indicó que la replicación de los cromosomas bacterianos es bidireccional: los dos extremos del lazo tienen horquillas de replicación activas.

Para determinar si los lazos de replicación se originan en un único punto del DNA, se necesitaban señales de referencia a lo largo de la molécula de DNA. Estas señales fueron proporcionadas por una técnica denominada **cartografiado por desnaturalización,** desarrollada por Ross Inman y colaboradores. Utilizando el cromosoma del bacteriófago λ de 48.502 pares de bases, Inman demostró que las secuencias ricas en pares de bases A=T pueden ser desnaturalizadas selectivamente. Las regiones desnaturalizadas forman burbujas de cadena sencilla (véase la Fig. 8–28). De forma similar se pueden desnaturalizar parcialmente DNA aislados que contengan bucles de replicación. Es posible medir la posición y el progreso de las horquillas de replicación que se han de medir y cartografiar utilizando las regiones desnaturalizadas como puntos de referencia. Esta técnica reveló que los lazos de replicación siempre se inician en un punto único denominado **origen.** También confirmó observaciones anteriores que indicaban que la replicación es normalmente bidireccional. En las moléculas de DNA circular, las dos horquillas de replicación vuelven a encontrarse en un punto del círculo, en el lado opuesto al origen. Desde entonces se han identificado y caracterizado orígenes de replicación específicos en bacterias y eucariotas inferiores.

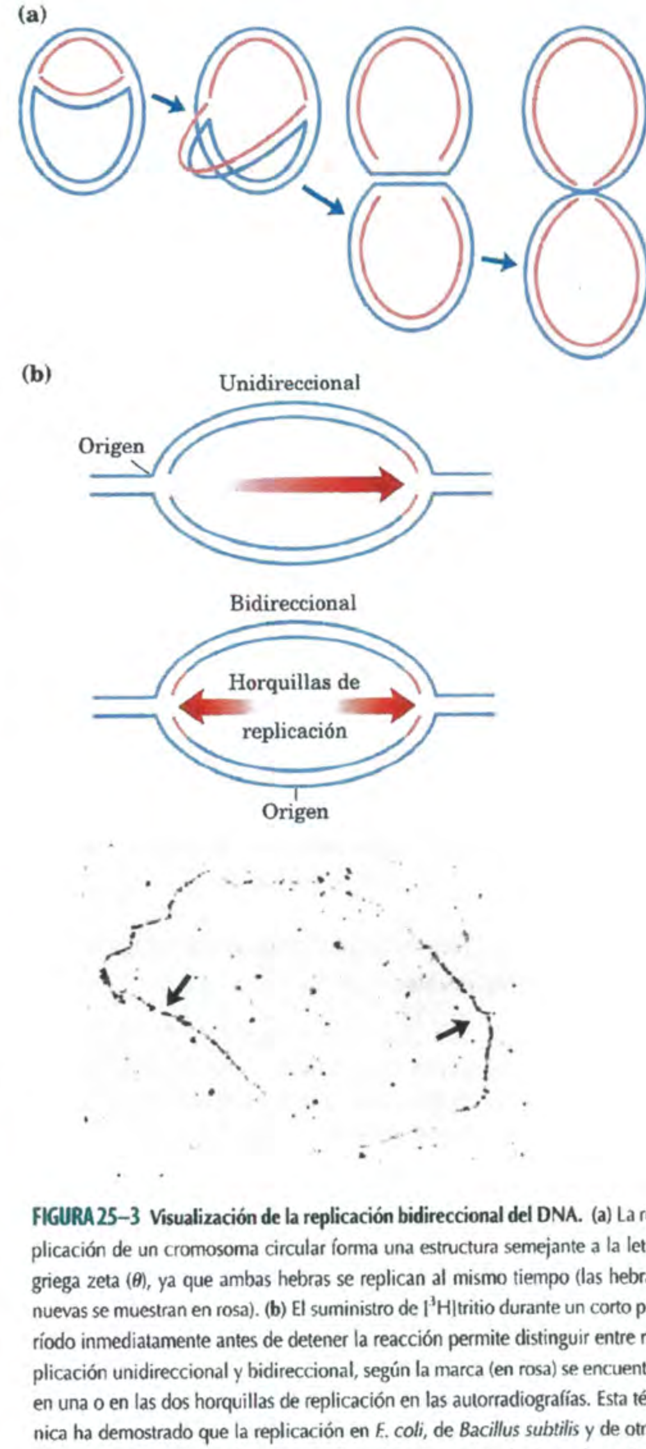


FIGURA 25–3 Visualización de la replicación bidireccional del DNA. **(a)** La replicación de un cromosoma circular forma una estructura semejante a la letra griega zeta (*θ*), ya que ambas hebras se replican al mismo tiempo (las hebras nuevas se muestran en rosa). **(b)** El suministro de [^{3}H]tritio durante un corto período inmediatamente antes de detener la reacción permite distinguir entre replicación unidireccional y bidireccional, según la marca (en rosa) se encuentre en una o en las dos horquillas de replicación en las autorradiografías. Esta técnica ha demostrado que la replicación en *E. coli*, de *Bacillus subtilis* y de otras bacterias es bidireccional. La autorradiografía muestra una burbuja de replicación de *B. subtilis*. La mayor densidad de granos (flechas) se observa en los extremos donde tiene lugar la replicación. La parte no replicada del cromosoma, fuera de la burbuja, no está marcada y por tanto no es visible.

La síntesis del DNA progresa en dirección 5′→ 3′ y es semi-discontinua Las cadenas de DNA siempre son sintetizadas en la dirección 5′→3′, siendo el 3′ OH libre el punto de elongación del DNA (los extremos 5′ y 3′ de una cadena de DNA se definen en la Fig. 8–7). Debido a que las dos cadenas de DNA son antiparalelas, la cadena que actúa de molde se lee del extremo 3′ al 5′.

Si la síntesis transcurre siempre en la dirección 5′→3′, ¿cómo pueden sintetizarse las dos cadenas simultáneamente? Si las dos fuesen sintetizadas *continuamente* a medida que se desplaza la horquilla de replicación, una tendría que ser sintetizada en dirección 3′→5′. Este problema fue resuelto for Reiji Okazaki y colaboradores en la década de 1960. Okazaki descu-

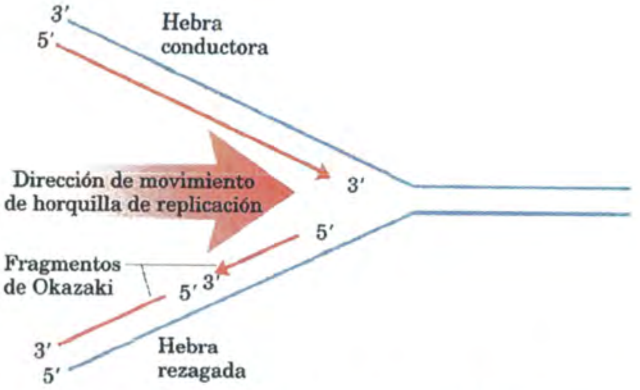


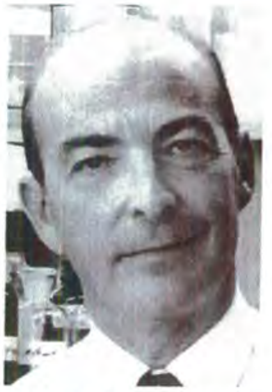
FIGURA 25–4 Identificación de las hebras del DNA en la horquilla de replicación. Una hebra nueva (rojo) de DNA se sintetiza siempre en la dirección 5'→3'. El molde se lee en dirección opuesta, 3'→5'. La hebra conductora se sintetiza ininterrumpidamente en la dirección seguida por la horquilla de replicación. La otra hebra, la hebra rezagada, es sintetizada de manera discontinua en trozos cortos (fragmentos de Okazaki) en dirección opuesta al desplazamiento de la horquilla de replicación. Los fragmentos de Okazaki son unidos a continuación por la DNA ligasa. En las bacterias, los fragmentos de Okazaki tienen una longitud de 1.000 a 2.000 nucleótidos. En las células eucarióticas tienen de 150 a 200 nucleótidos.

brió que una de las cadenas nuevas de DNA se sintetiza en forma de trozos cortos, denominados **fragmentos de Okazaki.** Este trabajo condujo finalmente a la conclusión de que una de las cadenas es sintetizada de modo continuo y la otra de modo discontinuo **(Fig. 25–4)**. La hebra continua o **hebra conductora** es aquella cuya síntesis en dirección 5'→3' transcurre en la *misma* dirección que el movimiento de la horquilla de replicación. La hebra discontinua o **hebra rezagada** es aquella cuya síntesis en dirección 5'→3' transcurre en dirección *opuesta* a la dirección del movimiento de la horquilla. Los fragmentos de Okazaki tienen una longitud entre unos pocos centenares y unos pocos miles de nucleótidos, según el tipo celular. Tal como veremos más adelante, las síntesis de la hebra conductora y de la hebra rezagada están estrechamente coordinadas.

El DNA es degradado por nucleasas

Para explicar la enzimología de la replicación del DNA, empezaremos con los enzimas que lo degradan, en lugar de con aquellos que lo sintetizan. Estos enzimas se denominan **nucleasas,** o **DNasas** si son específicas de DNA en lugar de RNA. Todas las células contienen varias nucleasas diferentes, que pueden clasificarse en dos amplias clases: exonucleasas y endonucleasas. Las **exonucleasas** degradan los ácidos nucleicos desde un extremo de la molécula. Muchas actúan sólo en dirección 5'→ 3' o bien en dirección 3'→5', eliminando nucleótidos sólo del extremo 5' o del 3', respectivamente, de una cadena de ácido nucleico de doble cadena. Las **endonucleasas** pueden empezar a degradar en sitios internos específicos de una cadena o molécula de ácido nucleico, reduciéndolo a fragmentos cada vez más pequeños. Unas pocas exonucleasas y endonucleasas degradan exclusivamente DNA de cadena sencilla. Hay unas pocas clases de endonucleasas de gran importancia que degradan secuencias de nucleótidos específicas (por ejemplo, las endonucleasas de restricción, de tanta importancia en biotecnología; véase el Capítulo 9, Fig. 9–2). En este capítulo y en los que siguen se encontrarán muchos tipos de nucleasas.

El DNA es sintetizado por DNA polimerasas



Arthur Kornberg, 1918–2007

La búsqueda de un enzima que pudiese sintetizar DNA empezó en 1955. El trabajo de Arthur Kornberg y colaboradores culminó con la purificación y caracterización de la DNA polimerasa de *E. coli*, un enzima con una sola cadena polipeptídica, conocido actualmente como **DNA polimerasa I** (M_r 103.000; codificada por el gen *polA*). Mucho después, se han encontrado en *E. coli* al menos otras cuatro DNA polimerasas distintas, descritas más adelante.

Los estudios detallados sobre la DNA polimerasa I revelaron características del proceso de síntesis del DNA que han resultado ser comunes a todas las DNA polimerasas. La reacción fundamental es la transferencia de un grupo fosforilo. El nucleófilo es el grupo 3' hidroxilo del nucleótido en el extremo 3' de la cadena en crecimiento. El ataque nucleofílico se produce sobre el fósforo α del desoxinucleósido 5'-trifosfato entrante **(Fig. 25–5)**. En la reacción se libera pirofosfato inorgánico. La ecuación general de la reacción es

$$\underset{\text{DNA}}{(\text{dNMP})_n} + \text{dNTP} \longrightarrow \underset{\substack{\text{DNA}\\\text{alargado}}}{(\text{dNMP})_{n+1}} + \text{PP}_i \qquad (25\text{–}1)$$

donde dNMP y dNTP son desoxinucleósidos 5'-monofosfato y 5'-trifosfato, respectivamente. La reacción aparentemente tiene lugar con sólo un cambio mínimo de energía libre, puesto que se forma un enlace fosfodiéster a expensas de un anhídrido fosfórico algo menos estable. Sin embargo, las interacciones no covalentes de apilamiento y de apareamiento de bases estabilizan el DNA alargado en relación con el nucleótido libre. Además, en la célula la formación de productos está favorecida por los 19 kJ/mol generados por la subsiguiente hidrólisis del producto pirofosfato por el enzima pirofosfatasa (p. 508).

Los trabajos iniciales sobre la DNA polimerasa I definieron dos requerimientos básicos para la polimerización del DNA. En primer lugar, todas las DNA polimerasas requieren un molde. La reacción de polimerización está dirigida por una cadena molde de DNA según las reglas de apareamiento de bases predichas por Watson y Crick: donde hay una guanina en el molde se añade una citosina a la nueva cadena y así sucesivamente. Éste fue un descubrimiento especialmente importante, no sólo porque proporcionó una base química para la replicación semiconservadora precisa del DNA, sino también porque representó el primer ejemplo de utilización de un molde para guiar una reacción biosintética.

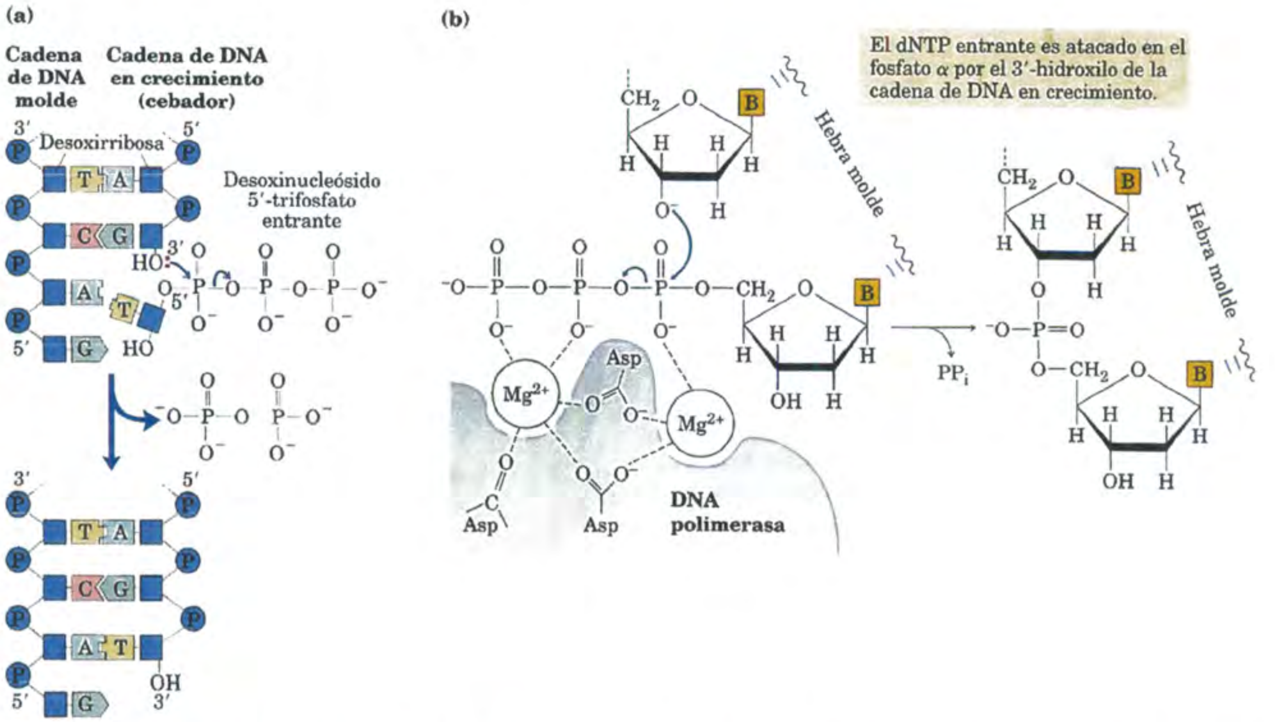


FIGURA DE MECANISMO 25–5 Elongación de una cadena de DNA. **(a)** La actividad de la DNA polimerasa I requiere una hebra desapareada que actúe de molde y una cadena cebadora que aporte un grupo hidroxilo libre en el extremo 3′, al cual puedan añadirse nuevas unidades nucleotídicas. Los nucleótidos entrantes son seleccionados en parte por apareamiento de bases con el nucleótido apropiado de la hebra molde. El producto de reacción tiene un nuevo 3′-hidroxilo libre, que permite añadir otro nucleótido. **(b)** El mecanismo catalítico probablemente utiliza dos iones Mg^{2+} coordinados con los grupos fosfato del nucleótido trifosfato entrante y con tres residuos de Asp, dos de los cuales están altamente conservados en todas las DNA polimerasas. El ión Mg^{2+} de la derecha de la figura facilita el ataque del grupo 3′-hidroxilo del cebador sobre el fosfato α del nucleótido trifosfato; el otro ión Mg^{2+} facilita el desplazamiento del pirofosfato. Ambos iones estabilizan la estructura del estado de transición pentacovalente. Las RNA polimerasas utilizan un mecanismo similar (véase la Fig. 26–1b). **Polimerización de nucleótidos por la DNA polimerasa**

Segundo, las polimerasas requieren un **cebador.** Un cebador es un segmento de cadena (complementario del molde) con un grupo 3′-hidroxilo libre al cual pueden añadirse nucleótidos. El extremo 3′ del cebador se denomina **extremo terminal del cebador.** Dicho de otro modo, parte de la cadena nueva ya tiene que encontrarse en su lugar; todas las DNA polimerasas, sin excepción, únicamente son capaces de añadir nucleótidos a una cadena preexistente. Muchos cebadores son oligonucleótidos de RNA, en lugar de DNA; enzimas especializados sintetizan los cebadores dónde y cuándo son requeridos.

Después de añadir un nucleótido a una cadena de DNA en crecimiento, la DNA polimerasa se disocia o bien se traslada a lo largo del molde y añade otro nucleótido. La disociación y la reasociación de la polimerasa pueden limitar la velocidad global de polimerización. El proceso es generalmente más rápido si la polimerasa añade más nucleótidos sin disociarse del molde. El número medio de nucleótidos añadidos antes de que una polimerasa se disocie define su **procesividad.** Las DNA polimerasas muestran una gran variación en su procesividad; algunas sólo añaden unos pocos nucleótidos antes de disociarse, mientras que otras añaden muchos millares. **Polimerización de nucleótidos por la DNA polimerasa**

La replicación es muy precisa

La replicación tiene lugar con un grado extraordinario de fidelidad. En *E. coli* se comete un error sólo cada 10^9 o 10^{10} nucleótidos incorporados. Dado que el cromosoma de *E. coli* tiene unos ~$4{,}6 \times 10^6$ pb esto significa que se comete un error cada 1.000 a 10.000 replicaciones. Durante la polimerización, la discriminación entre nucleótidos correctos e incorrectos se basa no solo en los puentes de hidrógeno que especifican el apareamiento correcto entre bases complementarias, sino también en la geometría común de los pares de bases estándar A=T y G≡C **(Fig. 25–6)**. El centro activo de la DNA polimerasa I acomoda solamente pares de bases con esta geometría. Un nucleótido incorrecto puede ser capaz de formar puentes de hidrógeno con una base del molde, pero generalmente no encajará en el centro activo. Las bases incorrectas pueden ser desechadas antes de que se forme el enlace fosfodiéster.

La precisión de la propia reacción de polimerización es, no obstante, insuficiente para explicar el elevado grado de fidelidad de la replicación. Cuidadosas medidas in vitro han demostrado que las DNA polimerasas insertan un nucleótido incorrecto de cada 10^4 a 10^5 correctos. Estos errores se cometen a veces porque una base se encuentra momentáneamente en una forma tautomérica infrecuente (véase la Fig. 8–9), que permite formar puentes de hidrógeno con una base incorrecta. La tasa de error disminuye in vivo gracias a mecanismos enzimáticos adicionales.

Un mecanismo intrínseco de virtualmente todas las DNA polimerasas es una actividad exonucleolítica 3′→5′ independiente, que hace posible realizar una segunda comprobación de cada nucleótido una vez ha sido añadido. Esta actividad nucleo-

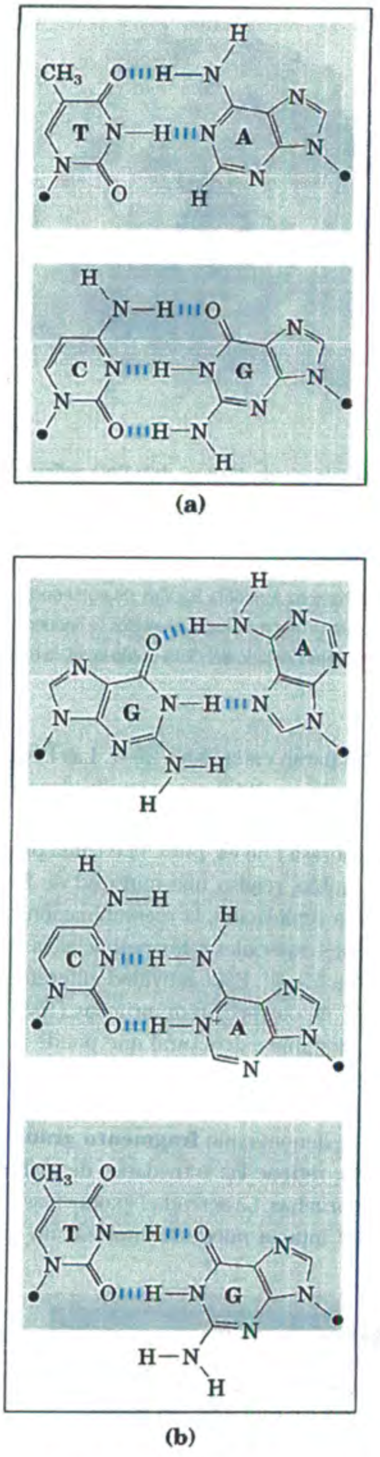


FIGURA 25–6 Contribución de la geometría de los pares de bases a la fidelidad de la replicación del DNA. **(a)** Los pares de bases estándar A=T y G≡C tienen geometrías similares y un sitio de unión capaz de acomodar uno de ellos (sombreado en azul) generalmente acomodará el otro. **(b)** La geometría de los pares de bases incorrectos puede excluirlos del centro activo, como ocurre con la DNA polimerasa.

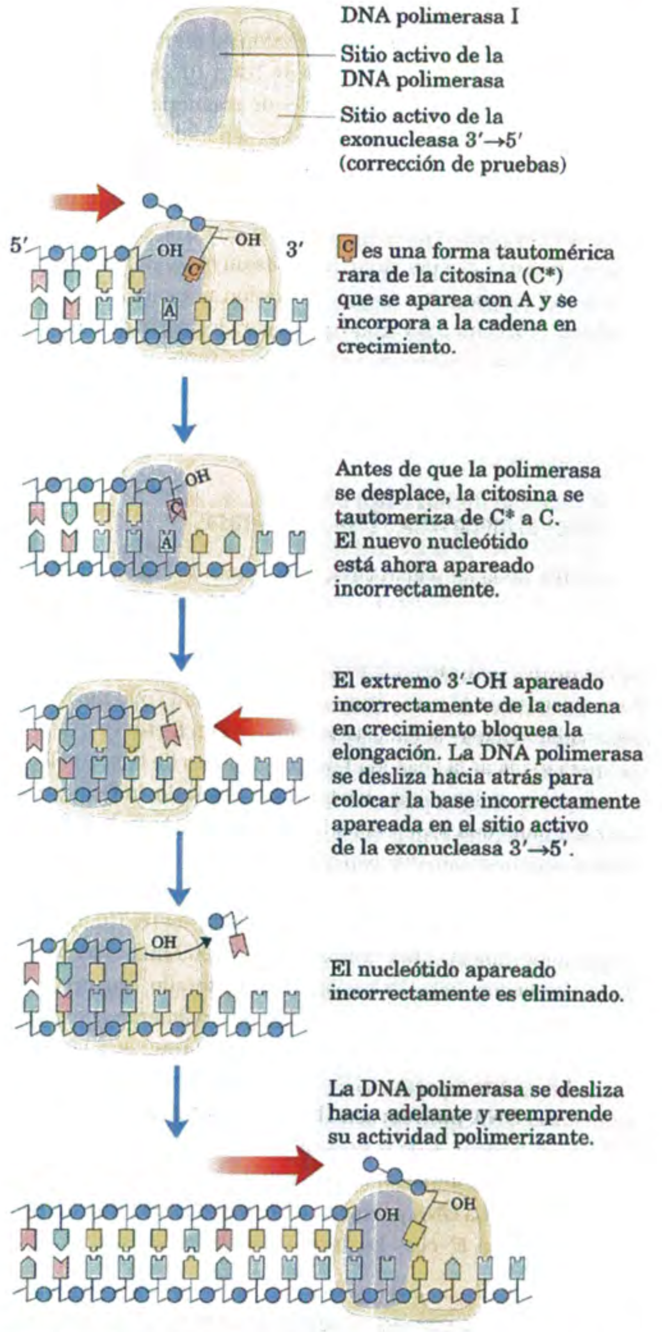


FIGURA 25–7 Ejemplo de corrección de errores por la actividad exonucleasa 3'→5' de la DNA polimerasa I. El análisis estructural ha localizado la actividad exonucleasa por delante de la actividad polimerizante en el desplazamiento del enzima a lo largo del DNA. Una base mal apareada (en este caso, un apareamiento incorrecto C–A) impide la translocación de la DNA polimerasa I al sitio siguiente. Deslizándose hacia atrás, el enzima corrige el error con su actividad exonucleasa 3'→5' y, a continuación, reemprende su actividad polimerasa en la dirección 5'→3'.

lítica permite al enzima eliminar un nucleótido recién incorporado y es altamente específica para pares de bases incorrectos (**Fig. 25–7**). Si la polimerasa ha añadido un nucleótido incorrecto, se inhibe la translocación del enzima a la posición donde ha de incorporarse el siguiente nucleótido. Esta pausa cinética ofrece la oportunidad de una corrección. La actividad exonucleasa 3'→5' elimina el nucleótido mal apareado y la polimerasa vuelve a empezar. Esta actividad, denominada de **corrección de pruebas,** no es simplemente la inversa de la reacción de polimerización (Ec. 25–1), puesto que no interviene el pirofosfato. Las actividades de polimerización y de corrección de pruebas de una DNA polimerasa se pueden medir por separado.

La corrección de pruebas mejora la precisión inherente de la reacción de polimerización en un factor de 10^2 a 10^3. En la DNA polimerasa I monomérica, las actividades de polimerización y de corrección de pruebas tienen sitios activos separados en el mismo polipéptido.

Con la selección de bases y la corrección de pruebas combinadas, la DNA polimerasa deja tras de sí un error cada 10^6 a 10^8 bases añadidas. Sin embargo, la precisión observada en células de *E. coli* es todavía mayor. La precisión adicional se debe a un sistema enzimático separado que repara los pares de bases incorrectos que permanecen después de la replicación. Este proceso, denominado reparación de apareamientos incorrectos, se describe, junto con otros procesos de reparación del DNA, en la Sección 25.2.

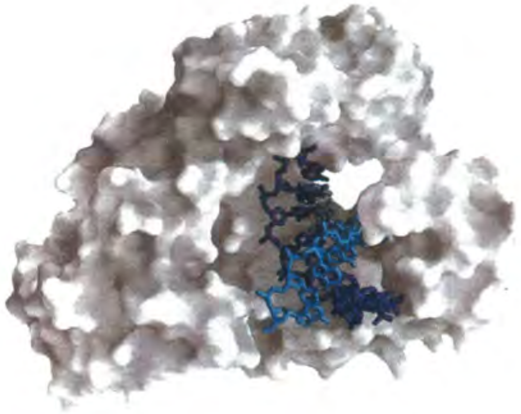


FIGURA 25–8 El fragmento grande (Klenow) de la DNA polimerasa I. Esta polimerasa está ampliamente distribuida en las bacterias. El fragmento de Klenow, producido por tratamiento proteolítico de la polimerasa, retiene las actividades de polimerización y de corrección de pruebas del enzima. Este fragmento de Klenow pertenece a la bacteria termófila *Bacillus stearothermophilus* (PDB ID 3BDP). El sitio activo para la unión de los nucleótidos se encuentra en el fondo de la hendidura en el extremo alejado del DNA unido (azul; la hebra azul oscuro es el molde).

E. coli posee al menos cinco DNA polimerasas

Más del 90% de la actividad DNA polimerasa de los extractos de *E. coli* se debe a la DNA polimerasa I. No obstante, poco después de su aislamiento en 1955, se empezaron a acumular pruebas de que este enzima no es adecuado para la replicación del cromosoma de *E. coli*. Primero, su velocidad (600 nucleótidos añadidos/min) es demasiado lenta (en un factor de 100 o más) para explicar la velocidad del movimiento de la horquilla de replicación en las células bacterianas. Segundo, la DNA polimerasa I tiene una procesividad relativamente baja. Tercero, estudios genéticos han demostrado que en la replicación intervienen muchos genes y, por tanto, muchas proteínas: claramente la DNA polimerasa I no actúa aisladamente. Cuarto, y de gran importancia, John Cairns aisló en 1969 una cepa bacteriana con el gen de la DNA polimerasa I alterado, que producía un enzima inactivo. Esta cepa era anormalmente sensible a los agentes que dañaban al DNA y, no obstante, ¡era viable!

La búsqueda de otras DNA polimerasas llevó al descubrimiento de la **DNA polimerasa II** y de la **DNA polimerasa III** en *E. coli* a principios de la década de 1970. La DNA polimerasa II es un enzima implicado en un tipo de reparación del DNA (Sección 25.3). La DNA polimerasa III es el enzima principal de la replicación en *E. coli*. Las propiedades de estas tres DNA polimerasas se comparan en la Tabla 25–1. Las DNA polimerasas IV y V, identificadas en 1999, están implicadas en un tipo de reparación del DNA poco habitual (Sección 25.2).

La DNA polimerasa I no es, pues, el enzima principal de la replicación; en cambio, realiza una multitud de funciones de limpieza durante la replicación, la recombinación y la reparación. Estas funciones especiales están potenciadas por su actividad exonucleolítica 5'→3'. Esta actividad, diferente de la exonucleolítica 5'→3' de corrección de pruebas (Fig. 25–7), está localizada en un dominio estructural que puede ser separado del enzima mediante un tratamiento proteolítico suave. Cuando se elimina el dominio exonucleolítico 5'→3', el fragmento restante (M_r 68.000), denominado **fragmento grande** o de **Klenow (Fig. 25–8)**, retiene las actividades de polimerización y de corrección de pruebas. La actividad exonucleasa 5'→3' de la DNA polimerasa I intacta puede reemplazar un segmento de

TABLA 25–1 Comparación de las tres DNA polimerasas de *E. coli*

	DNA polimerasa I	DNA polimerasa II	DNA polimerasa III
Gen estructural*	*polA*	*polB*	*polC (dnaE)*
Subunidades (número de tipos diferentes)	1	7	≥10
M_r	103.000	88.000†	791.500
Exonucleasa 3'→5' (correctora de pruebas)	Sí	Sí	Sí
Exonucleasa 5'→3'	Sí	No	No
Velocidad de polimerización (nucleótidos/s)	16–20	40	250–1.000
Procesividad (nucleótidos añadidos antes de la disociación de la polimerasa)	3–200	1.500	≥500.000

*Para los enzimas con más de una subunidad, el gen aquí citado codifica la subunidad con actividad polimerizante. Obsérvese que *dnaE* es una designación antigua del gen denominado actualmente *polC*.

†Se refiere solamente a la subunidad polimerizante. La DNA polimerasa II comparte varias subunidades con la DNA polimerasa III, entre ellas las subunidades $\beta, \gamma, \delta, \delta', \chi$ y ψ (véase la Tabla 25-2).

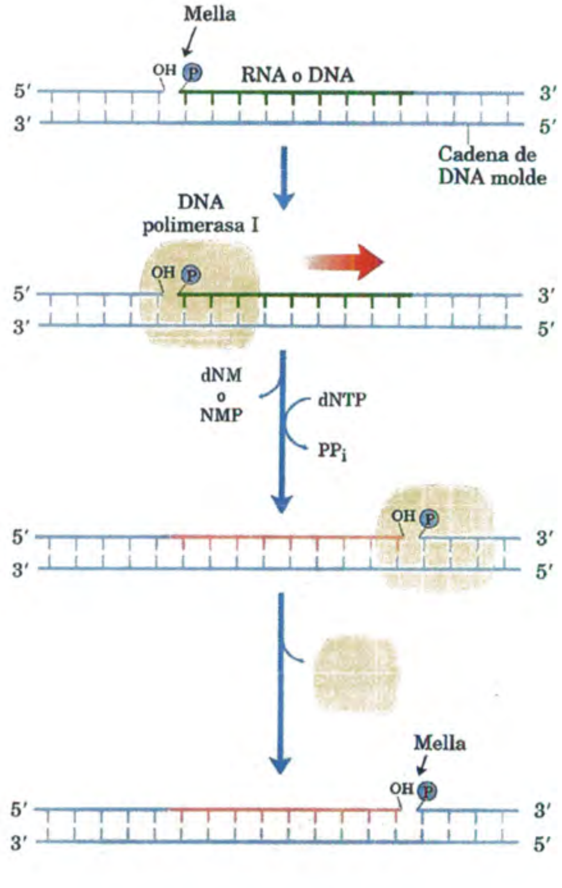


FIGURA 25–9 Traslación de la mella. En este proceso, una hebra de RNA o de DNA apareada al molde de DNA es simultáneamente degradada por la actividad exonucleasa 5′→3′ de la DNA polimerasa I y reemplazada por la actividad polimerasa del mismo enzima. Estas actividades son importantes tanto en la reparación del DNA como en la eliminación de los cebadores de RNA durante la replicación (como se describe más adelante). La hebra de ácido nucleico (DNA o RNA) que ha de ser eliminada se muestra en verde, la hebra de reemplazo se muestra en rojo. La síntesis de DNA comienza en una mella (un enlace fosfodiéster roto que deja un 3′ OH libre y un fosfato en 5′ libre). La polimerasa I extiende la hebra de DNA que no hace de molde y desplaza la mella a lo largo del DNA. Este proceso se denomina traslación de la mella. En el sitio donde se disocia la DNA polimerasa I queda una mella hasta que otro enzima la sella.

DNA (o RNA) apareado a la hebra molde, en un proceso llamado translación de la mella **(Fig. 25–9)**. La mayoría de DNA polimerasas restantes carecen de actividad exonucleasa 5′→3′.

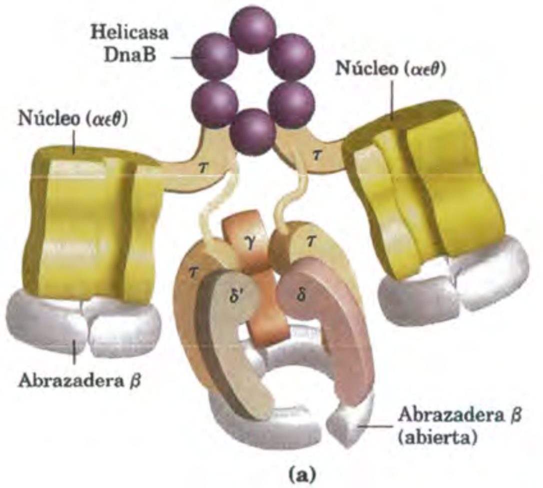
La DNA polimerasa III, con diez tipos de subunidades, es mucho más compleja que la DNA polimerasa I (Tabla 25–2). Sus actividades de polimerización y de corrección de pruebas residen en las subunidades α y ε (épsilon), respectivamente. La subunidad θ se asocia con las subunidades α y ε para formar la polimerasa núcleo, capaz de polimerizar el DNA, pero de procesividad limitada. Dos polimerasas núcleo se pueden unir mediante otro conjunto de subunidades, un complejo de carga de la abrazadera, o complejo γ, consistente en cinco subunidades de cuatro subtipos diferentes, $\tau_2\gamma\delta\delta'$. Las polimerasas núcleo se unen a través de las subunidades τ (tau). Dos subunidades adicionales, χ (chi) y ψ (psi), están unidas al complejo de carga de la abrazadera. El conjunto completo de 13 subunidades proteicas (de nueve tipos diferentes) se denomina DNA polimerasa III* **(Fig. 25–10a)**.

La DNA polimerasa III* puede polimerizar DNA, pero con una procesividad mucho menor que la necesaria para la replicación organizada del cromosoma completo. El necesario aumento de procesividad resulta de la unión de las subunidades β, cuatro de las cuales completan el holoenzima de la DNA polimerasa III. Las subunidades β se asocian por pares para formar una estructura toroidal que rodea al DNA y que actúa como una abrazadera (Fig. 25–10b). Cada dímero se asocia con un subconjunto núcleo de polimerasa III* (una abrazadera dimérica

TABLA 25–2 Subunidades de la DNA polimerasa III de *E. coli*

Subunidad	Número de subunidad por holoenzima	M_r de la subunidad	Gen	Función de la subunidad	
α	2	129.900	*polC (dnaE)*	Actividad polimerizante	Polimerasa núcleo
ε	2	27.500	*dnaQ (mutD)*	Actividad exonucleasa 3′→5′	
θ	2	8.600	*holE*	Estabilización de la subunidad ε	
τ	2	71.100	*dnaX*	Unión estable del molde; dimerización del enzima núcleo	Complejo de carga de la abrazadera (γ) que carga las subunidades β en la hebra rezagada en cada fragmento de Okazaki
γ	1	47.500	*dnaX**	Cargador de la abrazadera	
δ	1	38.700	*holA*	Abridor de la abrazadera	
δ'	1	36.900	*holB*	Cargador de la abrazadera	
χ	1	16.600	*holC*	Interacción con SSB	
ψ	1	15.200	*holD*	Interacción con γ y χ	
β	4	40.600	*dnaN*	Abrazadera del DNA necesaria para una procesividad óptima	

*La subunidad γ está codificada por una porción del gen de la subunidad τ, de modo que el 66% del amino-terminal de la subunidad τ tiene la misma secuencia de aminoácidos que la subunidad γ. La subunidad γ es generada por un mecanismo de corrimiento del marco de lectura de la traducción (véase la p. 1072) que provoca la finalización prematura de la traducción.



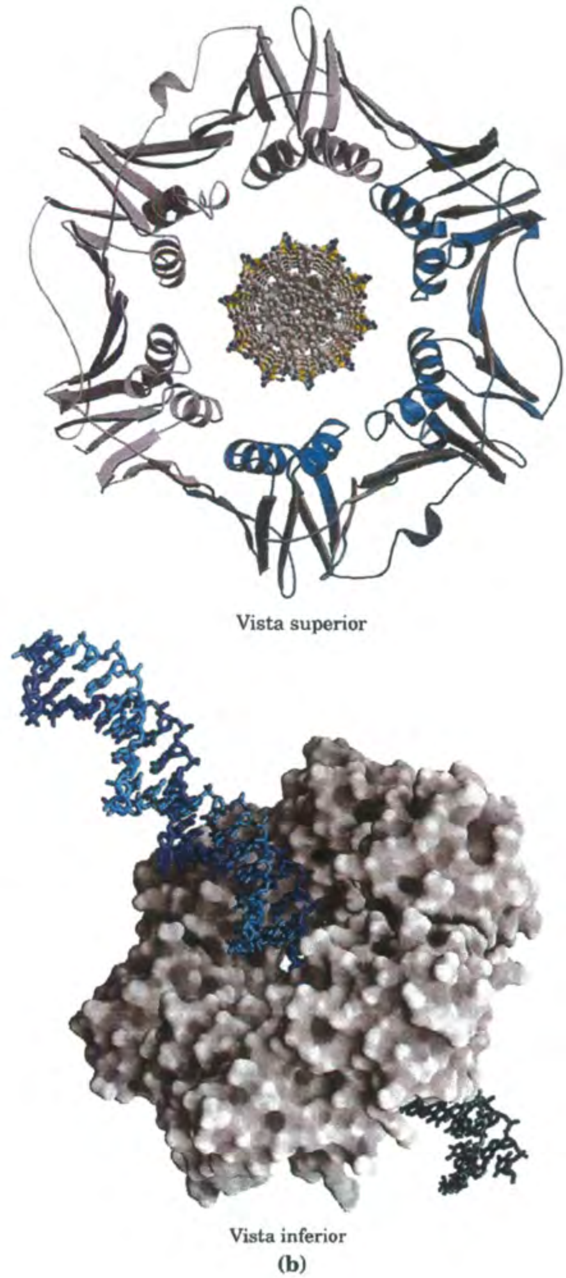


FIGURA 25–10 La DNA polimerasa III. **(a)** Arquitectura de la DNA polimerasa III bacteriana. Los dos dominios núcleo, compuestos de las subunidades α, ϵ y θ, están unidos por un complejo de carga de la abrazadera (también llamado complejo γ) de cinco subunidades (también conocido como el complejo de carga de la abrazadera) cuya composición es $\tau_2\gamma\delta\delta'$. Las subunidades γ y τ están codificadas por el mismo gen. La subunidad γ es una versión acortada de τ; la subunidad τ contiene por tanto un dominio idéntico a γ, además de un segmento adicional que interacciona con la polimerasa núcleo. Las otras dos subunidades de la DNA polimerasa III*, χ y ψ (no mostradas), también se unen al complejo de carga de la abrazadera. Dos abrazaderas β interaccionan con dos subconjuntos núcleo, siendo cada una de las abrazaderas un dímero de la subunidad β. El complejo interacciona con la DnaB helicasa a través de las subunidades τ. **(b)** Las dos subunidades β de la polimerasa III de *E. coli* forman una abrazadera circular que rodea el DNA. La abrazadera se desliza a lo largo de la molécula de DNA, aumentando la procesividad del holoenzima de la polimerasa III en más de 500.000 nucleótidos al impedir su disociación del DNA. La vista superior muestra las dos subunidades β como cintas grises y azul claro, rodeando un modelo de bolas del DNA. En la vista lateral, modelos de perfil de superficie de las subunidades β (gris) rodean un modelo de varillas de un a doble hélice de DNA (azul claro y oscuro) (adaptado de PDB ID 2POL).

por subconjunto núcleo) y se desliza a lo largo del DNA a medida que avanza la replicación. La abrazadera β deslizante impide la disociación de la DNA polimerasa III del DNA, lo cual aumenta de forma espectacular la procesividad en un factor de más de 500.000 (Tabla 25–1).

La replicación del DNA requiere muchos enzimas y factores proteicos

La replicación en *E. coli* necesita no sólo una DNA polimerasa, sino también 20 o más enzimas y proteínas diferentes, cada una con una tarea específica. El conjunto completo se ha denominado **sistema DNA replicasa** o **replisoma.** La complejidad enzimática de la replicación refleja los requerimientos de la estructura del DNA y las exigencias de fidelidad. Trataremos las clases principales de enzimas de la replicación desde el punto de vista de las tareas que tienen que afrontar.

El acceso a las cadenas de DNA tienen que actuar de molde requiere la separación de las dos cadenas parentales. Esta tarea corre a cargo generalmente de enzimas denominados **helicasas,** que se mueven a lo largo del DNA y separan las cadenas utilizando la energía química del ATP. La separación de las cadenas crea una tensión topológica en la estructura helicoidal del DNA (véase la Fig. 24–12), que es relajada por acción de las **topoisomerasas.** Las cadenas separadas son estabilizadas por **proteínas de unión al DNA.** Como se ha mencionado anteriormente, los cebadores, segmentos cortos de RNA sintetizados por enzimas denominados **primasas,** tienen que estar unidos al DNA antes de que las DNA polimerasas puedan empezar la síntesis. Posteriormente, los cebadores de RNA son eliminados y reemplazados por DNA; en *E. coli*, ésta es una de las muchas funciones de la DNA polimerasa I. Después de la eliminación del cebador de RNA y del relleno del hueco con DNA, queda una mella en la cadena azúcar-fosfato, en forma de un enlace fosfodiéster roto. Estas mellas son selladas por enzimas denominados **DNA ligasas.** Todos estos procesos tienen que estar coordinados y regulados. *E. coli* es el sistema en el cual las interconexiones entre los diferentes componentes son mejor conocidas.

La replicación del cromosoma de *E. coli* procede por etapas

La síntesis de una molécula de DNA se divide en tres fases: inicio, elongación y terminación. Estas fases se distinguen por las reacciones que tienen lugar y por los enzimas implicados. Como veremos en éste y en los dos capítulos siguientes, la síntesis de los principales biopolímeros que contienen información, DNA, RNA y proteínas, se puede entender también en términos de las tres mismas fases, cada una con sus características peculiares. Los procesos que se describen a continuación reflejan la información obtenida de experimentos in vitro, utilizando proteínas purificadas de *E. coli*, aunque todos los sistemas de replicación comparten los mismos principios básicos.

Inicio El origen de la replicación de *E. coli*, *oriC*, consta de 245 pb, que contienen secuencias de DNA muy conservadas entre los orígenes de replicación bacterianos. La posición de las secuencias conservadas se ilustra en la **Figura 25–11**. Hay dos tipos de secuencias de especial interés: cinco repeticiones de una secuencia de 9 pb (sitios R), que actúan de sitios de unión para la proteína clave de inicio DnaA, y una región rica en pares de bases A=T denominada **elemento de desenrollamiento del DNA (DUE).** Hay tres sitios de unión de DnaA (sitios I) adicionales y sitios de unión para las proteínas IHF (factor de integración del huésped) y FIS (factor de estimulación de la inversión). Estas dos proteínas fueron descubiertas como componentes necesarios para ciertas reacciones de recombinación descritas más adelante en este capítulo y sus nombres son reflejo de sus funciones. Otra proteína de unión al DNA; HU (una proteína bacteriana del tipo de las histonas originalmente denominada factor U) también participa, pero no tiene un sitio específico de unión.

En la fase de inicio de la replicación participan al menos 10 enzimas o proteínas diferentes (incluidos en la Tabla 25–3). Éstas se encargan de abrir la hélice del DNA en el origen y establecen un complejo precebador para las reacciones posteriores. El componente clave en el proceso de inicio es la proteína DnaA un miembro de la familia proteica de las **AAA+ ATPasa** (*AT*Pasas *a*sociadas con diversas *a*ctividades celulares). Muchas AAA+ ATPasas, incluída la DnaA, forman oligómeros e hidrolizan ATP de forma relativamente lenta. Esta hidrólisis de ATP actúa como un interruptor para la interconversión de la proteína entre dos estados. En el caso de la DnaA, la forma con ATP unido es activa y la forma con ADP unido es inactiva.

Ocho moléculas de proteína DnaA, todas en el estado de ATP unido, se ensamblan para formar un complejo helicoidal que abarca los sitios R e I en *oriC* **(Fig. 25–12)**. La DnaA tiene mayor afinidad por los sitios R que por los sitios I, y se une con la misma afinidad a los sitios R tanto con ATP como con ADP unido. Los sitios I, que unen solamente la forma de DnaA con ATP unido, garantizan la discriminación entre las formas activa

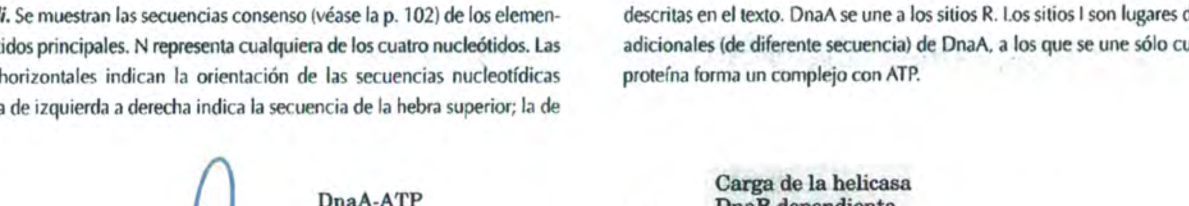


FIGURA 25–11 Disposición de las secuencias en el origen de replicación *oriC* de *E. coli*. Se muestran las secuencias consenso (véase la p. 102) de los elementos repetidos principales. N representa cualquiera de los cuatro nucleótidos. Las flechas horizontales indican la orientación de las secuencias nucleotídicas (la flecha de izquierda a derecha indica la secuencia de la hebra superior; la de derecha a izquierda, la hebra inferior). FIS e IHF son sitios de unión para proteínas descritas en el texto. DnaA se une a los sitios R. Los sitios I son lugares de unión adicionales (de diferente secuencia) de DnaA, a los que se une sólo cuando la proteína forma un complejo con ATP.

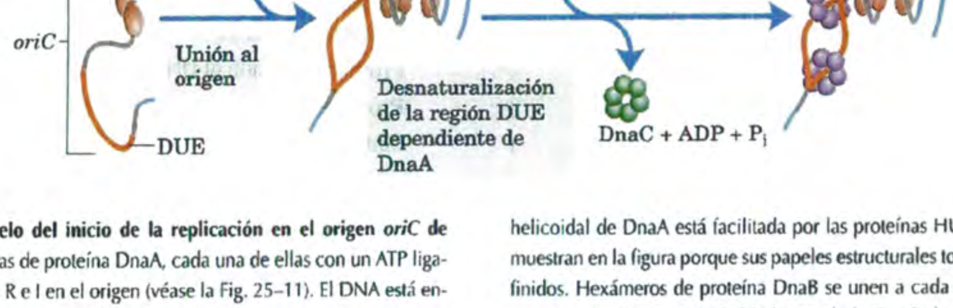


FIGURA 25–12 Modelo del inicio de la replicación en el origen *oriC* de *E. coli*. Ocho moléculas de proteína DnaA, cada una de ellas con un ATP ligado, se unen a los sitios R e I en el origen (véase la Fig. 25–11). El DNA está enrollado alrededor de este complejo, formando una estructura helicoidal dextrógira. La región DUE rica en A=T se desnaturaliza a consecuencia de la tensión generada por la unión adyacente de DnaA. La formación del complejo helicoidal de DnaA está facilitada por las proteínas HU, IHF y FIS, que no se muestran en la figura porque sus papeles estructurales todavía no están bien definidos. Hexámeros de proteína DnaB se unen a cada hebra con ayuda de la proteína DnaC. La actividad helicasa de la DnaB desenrolla todavía más al DNA como preparación para el cebado y la síntesis de DNA.

e inactiva del DnaA. El enrollamiento apretado hacia la derecha alrededor de este complejo introduce un superenrollamiento positivo efectivo (véase el Capítulo 24). La tensión producida en el DNA cercano provoca la desnaturalización de la región DUE rica en A=T. El complejo formado en el origen de replicación contiene otras proteínas de unión al DNA, HU, IHF y FIS, que facilitan la curvatura del DNA.

A continuación la proteína DnaC, otra AAA+ ATPasa, facilita la unión de la proteína DnaB a las hebras separadas de la región desnaturalizada. Un hexámero de DnaC, con ATP unido a cada una de sus subunidades, forma un fuerte complejo con la helicasa hexamérica en forma de anillo DnaB helicasa. La interacción DnaC–DnaB abre el anillo de DnaB, proceso facilitado por la interacción entre DnaB y DnaA. Dos de los hexámeros en forma de anillo de DnaB se asocian a DUE, uno a cada cadena de DNA. El ATP unido a DnaC se hidroliza, liberando DnaC y dejando DnaB unida al DNA.

La carga de la helicasa DnaB es el paso clave del inicio de la replicación. Como se trata de una helicasa replicativa, la DnaB migra a lo largo del DNA de cadena sencilla en dirección 5'→3', desenrollando el DNA a medida que avanza. Las helicasas DnaB de las dos cadenas del DNA viajan por tanto en direcciones opuestas, creando dos horquillas de replicación potenciales. Todas las demás proteínas de la horquilla de replicación están unidas directa o indirectamente a DnaB. El holoenzima de la DNA polimerasa III se une a través de las subunidades τ; otras interacciones adicionales de la DnaB se describen más adelante. Cuando empieza la replicación y las hebras del DNA se separan en la horquilla, muchas moléculas de proteína de unión al DNA de cadena sencilla (SSB) se unen y estabilizan las hebras separadas, mientras que la girasa de DNA (topoisomerasa II) alivia la tensión topológica creada más allá de la horquilla por la reacción de desenrollamiento.

El inicio es la única fase de la replicación que se sabe que está regulada, para que sólo tenga lugar una vez en cada ciclo celular. El mecanismo de regulación no se conoce con exactitud, aunque estudios bioquímicos y genéticos han proporcionado indicaciones de la presencia de varios mecanismos de regulación.

Una vez la DNA polimerasa III se ha asociado al DNA, junto con las subunidades β (que indica la finalización de la fase de inicio), la proteína Hda se une a las subunidades β e interacciona con DnaA para estimular la hidrólisis del ATP unido. La Hda es otra AAA+ ATPasa estrechamente relacionada con la DnaA (su nombre deriva de *h*omóloga de *DnaA*). La hidrólisis del ATP provoca el desmantelamiento del complejo DnaA en el origen. La lenta liberación del ADP por la DnaA y de nuevo la unión de ATP hace circular la proteína entre sus formas inactiva (con ADP unido) y activa (con ATP unido) en una escala temporal de 20 a 40 minutos.

El inicio de la replicación está afectado por la metilación del DNA y por interacciones con la membrana plasmática bacteriana. El DNA de *oriC* es metilado por la metilasa Dam (Tabla 25–3), que metila la adenina en N^6 dentro del palíndromo (5')GATC. (Dam se refiere a la *m*etilación de la *a*denina del *D*NA). La región *oriC* de *E. coli* está enriquecida en secuencias GATC, hay 11 dentro de sus 245 pb, mientras que la frecuencia promedio de GATC en el cromosoma de *E. coli* es de 1 cada 256 pb.

Inmediatamente después de que se haya producido la replicación, el DNA es semimetilado: las hebras parentales tienen las secuencias *oriC* metiladas, mientras que las hebras de nueva síntesis no lo están. Las secuencias *oriC* semimetiladas son secuestradas a través de la interacción con la membrana plasmática (el mecanismo aún es desconocido) y por unión de la proteína SeqA. Al cabo de un cierto tiempo, *oriC* es liberado de la membrana plasmática, se disocia SeqA y tiene que metilarse completamente el DNA por acción de la metilasa Dam antes de que pueda unirse de nuevo a DnaA e iniciar un nuevo ciclo de replicación del DNA.

TABLA 25–3 Proteínas requeridas para iniciar la replicación en el origen de *E. coli*

Proteína	M_r	Número de subunidades	Función
Proteína DnaA	52.000	1	Reconoce la secuencia origen; abre el dúplex en sitios específicos del origen
Proteína DnaB (helicasa)	300.000	6*	Desenrolla el DNA
Proteína DnaC	174.000	6*	Requerida para la unión de DnaB en el origen
HU	19.000	2	Proteína tipo histona; proteína de unión al DNA; estimula el inicio
FIS	22.500	2*	Proteína de unión al DNA; estimula el inicio
IHF	22.000	2	Proteína de unión al DNA; estimula el inicio
Primasa (proteína DnaG)	60.000	1	Sintetiza cebadores de RNA
Proteína de unión a DNA de cadena sencilla (SSB)	75.600	4*	Se une al DNA de cadena sencilla
DNA girasa (DNA topoisomerasa II)	400.000	4	Libera la tensión torsional generada por el desenrollamiento del DNA
Metilasa Dam	32.000	1	Metila secuencias (5')GATC en *oriC*

*En estos casos las subunidades son idénticas.

Elongación La fase de elongación en la replicación consiste en dos operaciones distintas, pero relacionadas: la síntesis de la cadena conductora y la síntesis de la cadena rezagada. En la síntesis de ambas cadenas son importantes varios enzimas que se encuentran en la horquilla de replicación. El DNA parental primero es desenrollado por DNA helicasas y la tensión topológica resultante es liberada por las topoisomerasas. Las SSB estabilizan a continuación cada una de las cadenas separadas. A partir de este punto, los procesos de síntesis de la cadena conductora y de la cadena rezagada difieren radicalmente.

La síntesis de la cadena conductora, la más sencilla de las dos, empieza con la síntesis de un corto cebador (10 a 60 nucleótidos) de RNA por la primasa (proteína DnaG) en el origen de replicación. La DnaG interacciona con la helicasa DnaB para llevar cabo esta reacción y el cebador es sintetizado en dirección opuesta a la del movimiento de la helicasa DnaB. En efecto, la helicasa DnaB se mueve a lo largo de la hebra que se convierte en la hebra rezagada durante la síntesis del DNA; sin embargo, el primer cebador depositado en la primera interacción DnaG–DnaB sirve para cebar la síntesis de la hebra conductora en dirección opuesta. Los desoxirribonucleótidos son añadidos a este cebador por un complejo de DNA polimerasa III unida a la helicasa DnaB anclada en la hebra de DNA opuesta. Seguidamente, la síntesis de la hebra conductora transcurre de manera continua, al mismo ritmo que el desenrollamiento del DNA en la horquilla de replicación.

La síntesis de la hebra rezagada, como ya hemos indicado, se realiza a trozos de corta longitud, los fragmentos de Okazaki **(Fig. 25–13a)**. Primero, la primasa sintetiza un cebador de RNA y, como en la síntesis de la hebra conductora, la DNA polimerasa III se une al cebador de RNA y añade desoxirribonucleótidos (Fig. 25–13b). Hasta aquí, la síntesis de los fragmentos de Okazaki parece sencilla, pero en realidad es muy compleja. La complejidad reside en la *coordinación* de la síntesis de la hebra conductora y de la hebra rezagada. Ambas hebras son producidas por un *único* dímero asimétrico de DNA polimerasa III. Para ello la hebra rezagada forma un lazo, tal como se muestra en la **Figura 25–14**, que aproxima los dos puntos de polimerización.

La síntesis de los fragmentos de Okazaki en la hebra rezagada pone en juego complejas actividades enzimáticas. La helicasa DnaB y la primasa DnaG constituyen una unidad funcional dentro del complejo de replicación, denominado **primosoma.** La DNA polimerasa III usa un juego de sus subunidades núcleo (la polimerasa núcleo) para la síntesis continua de la hebra conductora, mientras que el otro juego de subunidades núcleo circula entre un fragmento de Okazaki y el siguiente sobre el bucle formado por la hebra rezagada. La helicasa DnaB , unida por delante de la DNA polimerasa III, desenrolla el DNA en la horquilla de replicación (Fig. 25–14a), a medida que viaja a lo largo del molde de la hebra rezagada en dirección 5'→3'. La primasa DnaG se asocia ocasionalmente con la helicasa DnaB y sintetiza

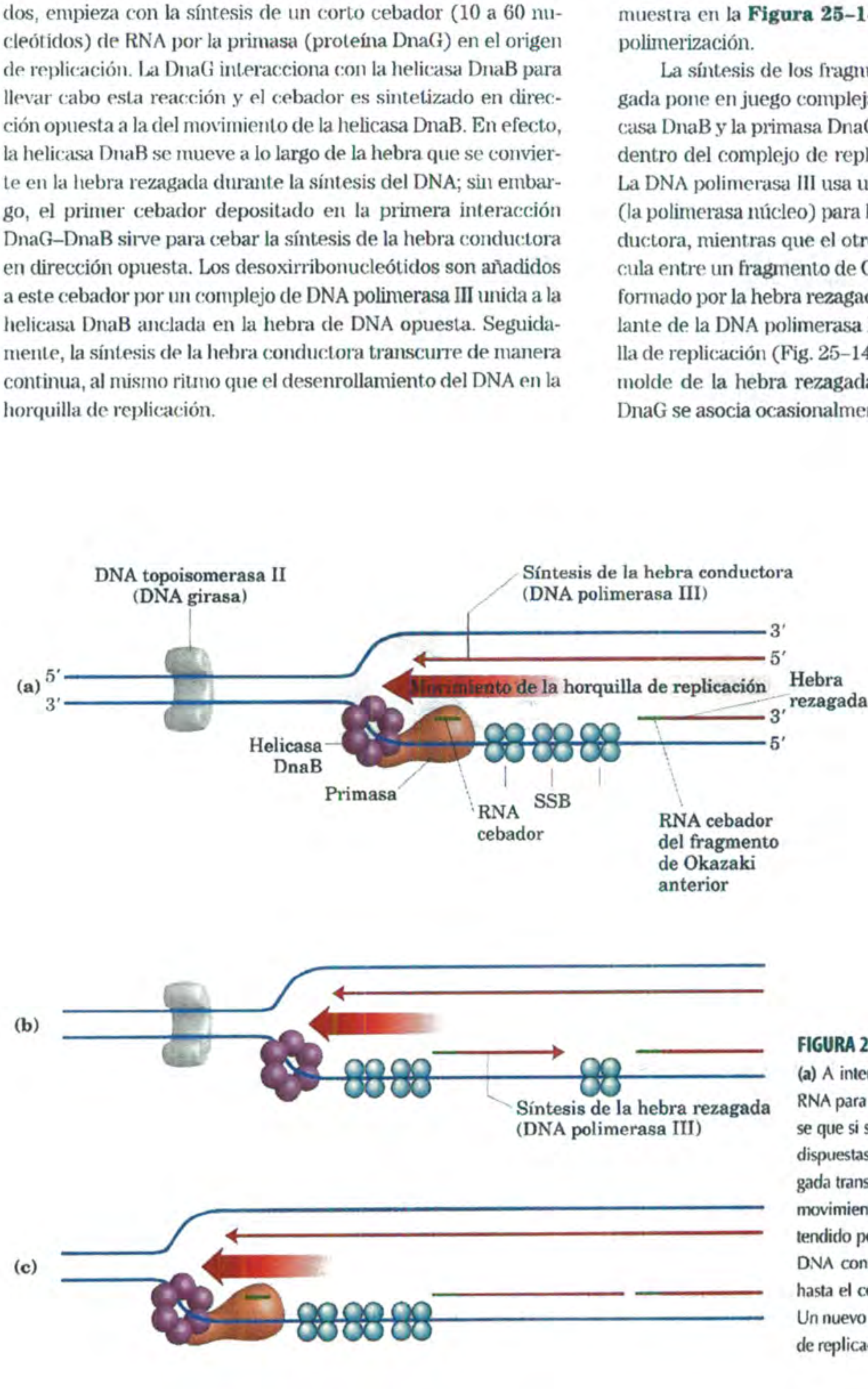


FIGURA 25–13 Síntesis de fragmentos de Okazaki. **(a)** A intervalos, la primasa sintetiza un cebador de RNA para un nuevo fragmento de Okazaki. Obsérvese que si suponemos que las dos hebras molde están dispuestas paralelamente, la síntesis de la hebra rezagada transcurre formalmente en dirección opuesta al movimiento de la horquilla. **(b)** Cada cebador es extendido por la DNA polimerasa III. **(c)** La síntesis de DNA continúa hasta que el fragmento se extiende hasta el cebador del fragmento de Okazaki anterior. Un nuevo cebador es sintetizado cerca de la horquilla de replicación para empezar de nuevo el proceso.

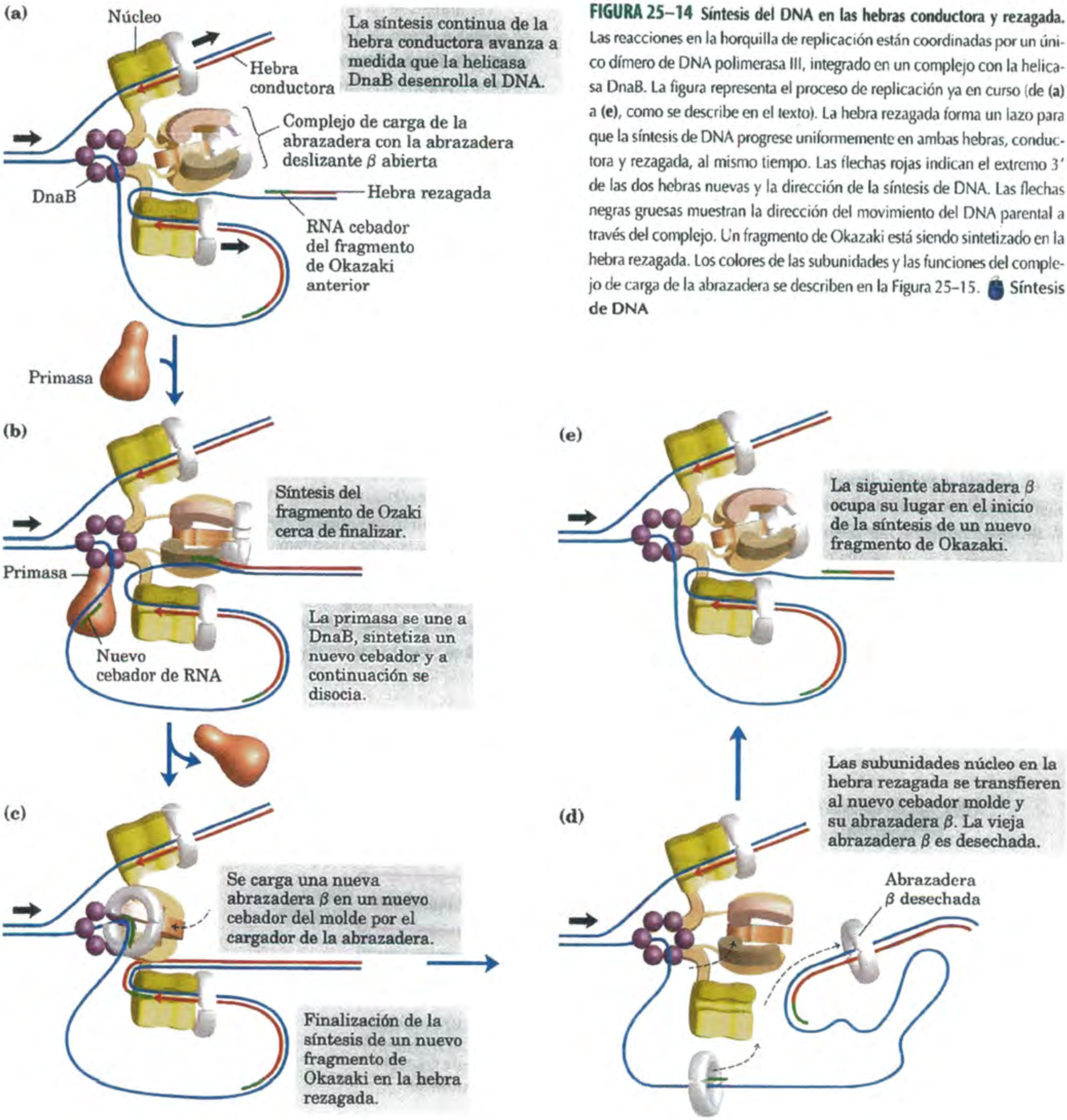


FIGURA 25–14 Síntesis del DNA en las hebras conductora y rezagada. Las reacciones en la horquilla de replicación están coordinadas por un único dímero de DNA polimerasa III, integrado en un complejo con la helicasa DnaB. La figura representa el proceso de replicación ya en curso (de **(a)** a **(e)**, como se describe en el texto). La hebra rezagada forma un lazo para que la síntesis de DNA progrese uniformemente en ambas hebras, conductora y rezagada, al mismo tiempo. Las flechas rojas indican el extremo 3′ de las dos hebras nuevas y la dirección de la síntesis de DNA. Las flechas negras gruesas muestran la dirección del movimiento del DNA parental a través del complejo. Un fragmento de Okazaki está siendo sintetizado en la hebra rezagada. Los colores de las subunidades y las funciones del complejo de carga de la abrazadera se describen en la Figura 25–15. **Síntesis de DNA**

un corto cebador de RNA (Fig. 25–14b). Una nueva abrazadera deslizante β es entonces posicionada en el cebador por el complejo de carga de la abrazadera de la DNA polimerasa III (Fig. 25–14c). Cuando se ha completado la síntesis de un fragmento de Okazaki, la replicación se detiene y las subunidades núcleo de la DNA polimerasa III se disocian de su abrazadera deslizante β (y del fragmento de Okazaki completado) y se asocian con la siguiente abrazadera (Fig. 25–14d, e). Ello inicia la síntesis de un nuevo fragmento de Okazaki. Como se ha indicado anteriormente, el conjunto del complejo responsable de la síntesis coordinada en la horquilla de replicación se denomina replisoma. Las proteínas que actúan en la horquilla de replicación se enumeran en la Tabla 25–4.

El complejo de carga de la abrazadera de la DNA polimerasa III, consistente en parte de las dos subunidades τ, junto con las subunidades γ, δ, y δ' también es una AAA+ ATPasa. Este complejo se une al ATP y a la nueva abrazadera β deslizante. La unión genera tensión en la abrazadera dimérica, lo que provoca la apertura del anillo en la interfase de una de las subunidades **(Fig. 25–15)**. La recién cebada hebra rezagada se desliza al interior del anillo a través de la discontinuidad. A continuación, el cargador de la abrazadera hidroliza ATP,

TABLA 25–4 Proteínas del replisoma de *E. coli*

Proteína	M_r	Número de subunidades	Función
SSB	75.600	4	Unión a DNA de cadena sencilla
Proteína DnaB (helicasa)	300.000	6	Desenrollamiento del DNA; componente del primosoma
Primasa (proteína DnaG)	60.000	1	Síntesis de RNA cebador; componente del primosoma
DNA polimerasa III	791.500	17	Elongación de la cadena nueva
DNA polimerasa I	103.000	1	Relleno de huecos, eliminación de cebadores
DNA ligasa	74.000	1	Ligación
DNA girasa (DNA topoisomerasa II)	400.000	4	Superenrollamiento

Fuentes: Modificado de Kornberg, A. (1982) *Supplement to DNA Replication*, TABLA S11-2, W. H. Freeman and Company, New York.

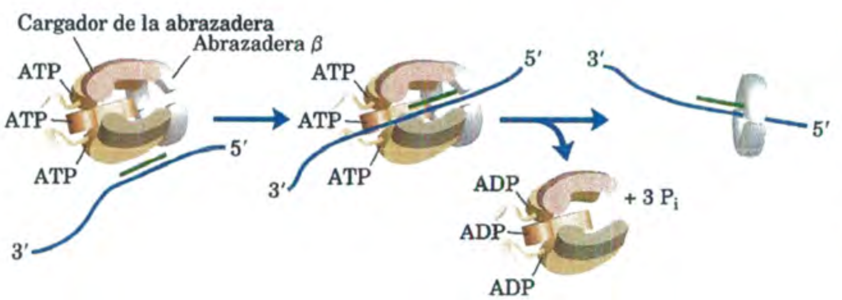


FIGURA 25–15 Cargador de la abrazadera de la DNA polimerasa III. Las cinco subunidades del complejo de carga de la abrazadera son las subunidades γ, δ y δ′ y el dominio amino-terminal de cada subunidad τ (véase la Fig. 25–10). El complejo se une a tres moléculas de ATP y a una abrazadera β dimérica. La unión fuerza la apertura de la abrazadera β en una de las interfases entre sus dos subunidades. La hidrólisis del ATP unido permite de nuevo el cierre de la abrazadera β alrededor del DNA.

liberando la abrazadera β deslizante que se cierra alrededor del DNA.

El replisoma efectúa una rápida síntesis de DNA a un ritmo de unos 1.000 nucleótidos por segundo en cada hebra (conductora y rezagada). Una vez ha finalizado la síntesis de un fragmento de Okazaki, su cebador de RNA es eliminado y reemplazado con DNA por la DNA polimerasa I y la mella restante es sellada por la DNA ligasa **(Fig. 25–16)**.

La DNA ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un 3′ hidroxilo, al final de una hebra de DNA y un

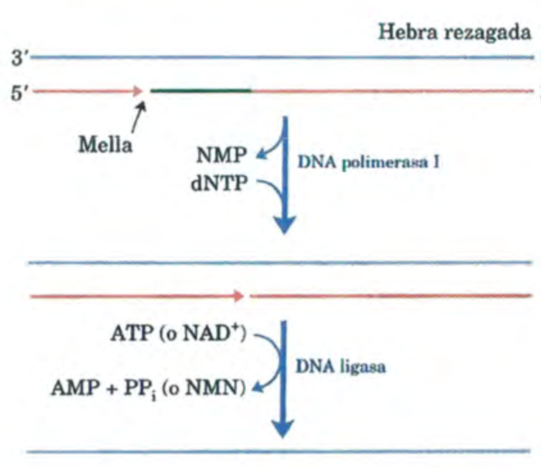


FIGURA 25–16 Etapas finales de la síntesis de los segmentos de la hebra rezagada. Los cebadores de RNA de la hebra rezagada son eliminados por la actividad exonucleasa 5′→3′ de la DNA polimerasa I, siendo reemplazados con DNA por el mismo enzima. La mella restante es sellada por la DNA ligasa. El papel del ATP o del NAD^+ se muestra en la Fig. 25–17.

5′ fosfato al final de otra cadena. El fosfato debe ser activado por adenilación. Las DNA ligasas aisladas de virus y eucariotas utilizan ATP con este fin. Las DNA ligasas de bacterias son especiales ya que utilizan NAD^+, un cofactor que normalmente se utiliza en las reacciones de transferencia de hidruro (véase la Fig. 13–24) como fuente del grupo activador AMP **(Fig. 25–17)**. La DNA ligasa es otro enzima del metabolismo del DNA que se ha convertido en un importante reactivo en los experimentos de DNA recombinante (véase la Fig. 9–1).

Terminación Finalmente, las dos horquillas de replicación del cromosoma circular de *E. coli* se encuentran en una región terminal que contiene múltiples copias de una secuencia de 20 pb denominada Ter **(Fig. 25–18)**. Las secuencias Ter están dispuestas en el cromosoma para crear una especie de trampa donde una horquilla de replicación puede entrar pero no salir. Las secuencias Ter son lugares de unión para una proteína denominada Tus (por sustancia de *u*tilización del *t*erminal). El complejo Tus-Ter puede detener sólo la replicación desde una dirección. Sólo actúa un único complejo Tus-Ter por ciclo de replicación, el primero con que topa una u otra horquilla de replicación. Dado que las horquillas de replicación que se mueven en direcciones opuestas se detienen al encontrarse, las secuencias Ter no parecen esenciales, pero es posible que sirvan para evitar la sobrerreplicación por una de las horquillas de replicación, en el caso de que la otra se haya retrasado o detenido a causa de daños en el DNA o por algún otro obstáculo.

Así pues, cuando una u otra horquilla de replicación topa con un complejo funcional Tus-Ter se detiene; la otra horquilla se detiene cuando encuentra la primera horquilla (ya detenida). Los pocos centenares de pares de bases de DNA finales entre estos grandes complejos proteicos se replican a continuación

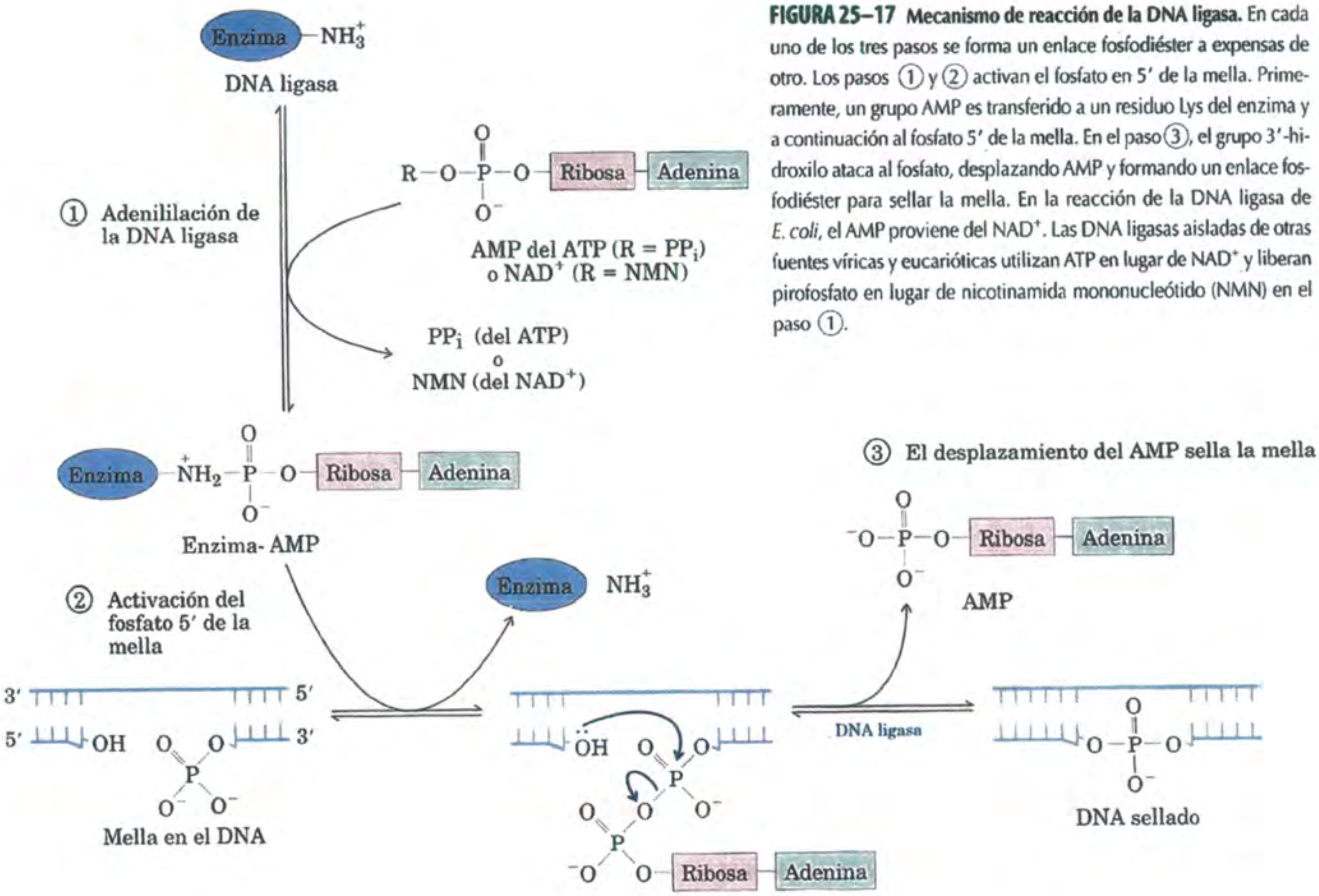


FIGURA 25–17 Mecanismo de reacción de la DNA ligasa. En cada uno de los tres pasos se forma un enlace fosfodiéster a expensas de otro. Los pasos ① y ② activan el fosfato en 5′ de la mella. Primeramente, un grupo AMP es transferido a un residuo Lys del enzima y a continuación al fosfato 5′ de la mella. En el paso ③, el grupo 3′-hidroxilo ataca al fosfato, desplazando AMP y formando un enlace fosfodiéster para sellar la mella. En la reacción de la DNA ligasa de *E. coli*, el AMP proviene del NAD^+. Las DNA ligasas aisladas de otras fuentes víricas y eucarióticas utilizan ATP en lugar de NAD^+ y liberan pirofosfato en lugar de nicotinamida mononucleótido (NMN) en el paso ①.

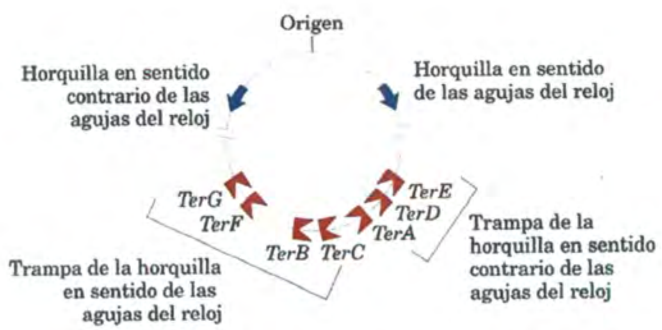


FIGURA 25–18 Terminación de la replicación del cromosoma en *E. coli*. Las secuencias Ter (de *TerA* a *TerF*) se encuentran dispuestas en el cromosoma en dos grupos con orientación opuesta.

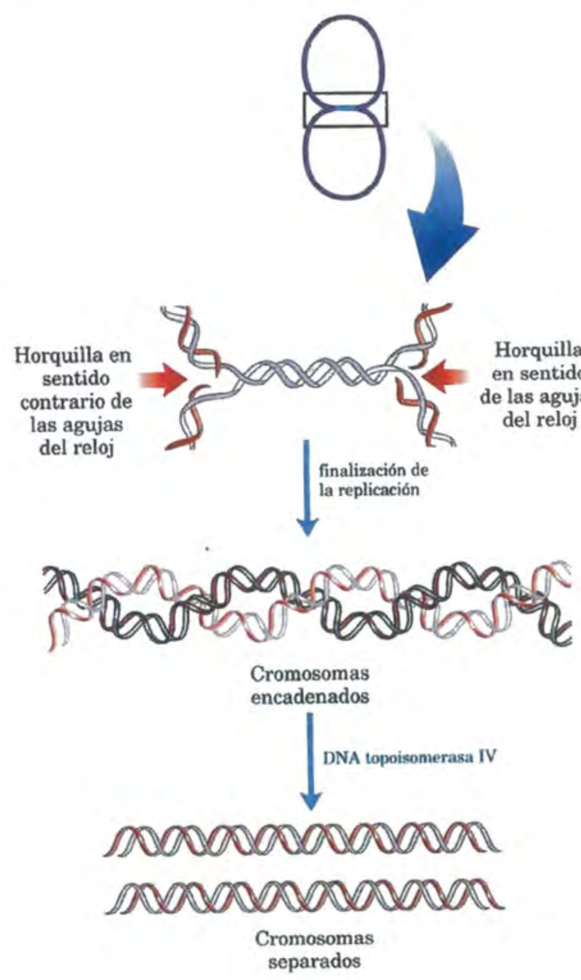


FIGURA 25–19 Papel de las topoisomerasas en la terminación de la replicación. La replicación del DNA entre las horquillas de replicación opuestas deja los cromosomas recién completados encadenados, es decir, ligados topológicamente. Los círculos no están unidos covalentemente, pero no pueden separarse porque están entrelazados y cerrados covalentemente. La separación de los círculos encadenados requiere la acción de las topoisomerasas. En *E. coli*, una topoisomerasa de tipo II, llamada DNA topoisomerasa IV, tiene el papel principal en la separación de los cromosomas encadenados; corta transitoriamente las dos hebras de DNA de uno de los cromosomas, permitiendo que el otro cromosoma pase a través de la brecha.

(*mediante un mecanismo todavía desconocido*). El resultado final son dos cromosomas circulares ligados en el espacio (encadenados) **(Figura 25–19)**. Los círculos de DNA unidos de este modo se denominan **catenados.** La separación de los círculos encadenados en *E. coli* requiere topoisomerasa IV (un tipo de topoisomerasa II). Los cromosomas separados son a continuación segregados entre las células hijas en la división celular. La fase terminal de la replicación de otros cromosomas circulares, incluidos muchos virus de DNA que infectan células eucarióticaos, es similar.

La replicación en las células eucarióticas es similar pero más compleja

Las moléculas de DNA de las células eucarióticas son considerablemente mayores que las de las bacterias y están organizadas en estructuras nucleoproteicas complejas (cromatina; p. 962). Los rasgos esenciales de la replicación del DNA son los mismos en los eucariotas y en las bacterias, y muchos de los complejos proteicos están conservados funcional y estructuralmente. No obstante, la replicación en los eucariotas está regulada y coordinada con el ciclo celular, lo que obliga a introducir algunas complejidades adicionales.

Los orígenes de replicación tienen una estructura bien caracterizada en algunos eucariotas inferiores, pero están mucho menos definidos en los eucariotas superiores. En los vertebrados, diversas secuencias ricas en A=T pueden utilizarse en el inicio de la replicación, y los sitios pueden variar de una a otra división celular. La levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) tiene orígenes de replicación definidos, denominados secuencias de *r*eplicación *a*utónoma (ARS) o **replicadores.** Los replicadores de levadura abarcan unos 150 pb y contienen varias secuencias esenciales conservadas. En el genoma haploide de levadura se encuentran unos 400 replicadores repartidos a lo largo de los 16 cromosomas.

La replicación del DNA celular una sola vez por ciclo está sometida a regulación, que depende en gran parte de proteínas denominadas ciclinas y de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) con las que forman complejos (p. 469). Las ciclinas son rápidamente destruidas por proteólisis dependiente de ubiquitina al final de la fase M (mitosis), y la ausencia de ciclinas permite la formación de **complejos prerreplicativos (preRC)** en los sitios de inicio de la replicación. En las células en rápido crecimiento, los preRC se forman al final de la fase M. En las células de crecimiento lento no se forman hasta el final de G1. La formación de los preRC permite que la célula sea competente para la replicación, hecho en ocasiones denominado **autorización.**

Como en las bacterias, el evento clave del inicio de la replicación en todos los eucariotas es la carga de la replicasa replicativa, un complejo heterohexamérico de **proteínas de mantenimiento del minicromosoma (MCM)** (de MCM2 a MCM7). La helicasa MCM2–7 tiene forma de anillo y funciona de forma similar a la helicasa DnaB. Se asocia al DNA mediante otro complejo de seis proteínas denominado **ORC (complejo de reconocimiento del origen) (Fig. 25–20)**. El ORC tiene cinco dominios AAA+ ATPasa en sus subunidades y es funcionalmente análogo a la DnaA bacteriana. Otras dos proteínas, CDC6 (*c*iclo de *d*ivisión *c*elular) y CDT1 (*t*ranscrito *1* *d*ependiente de

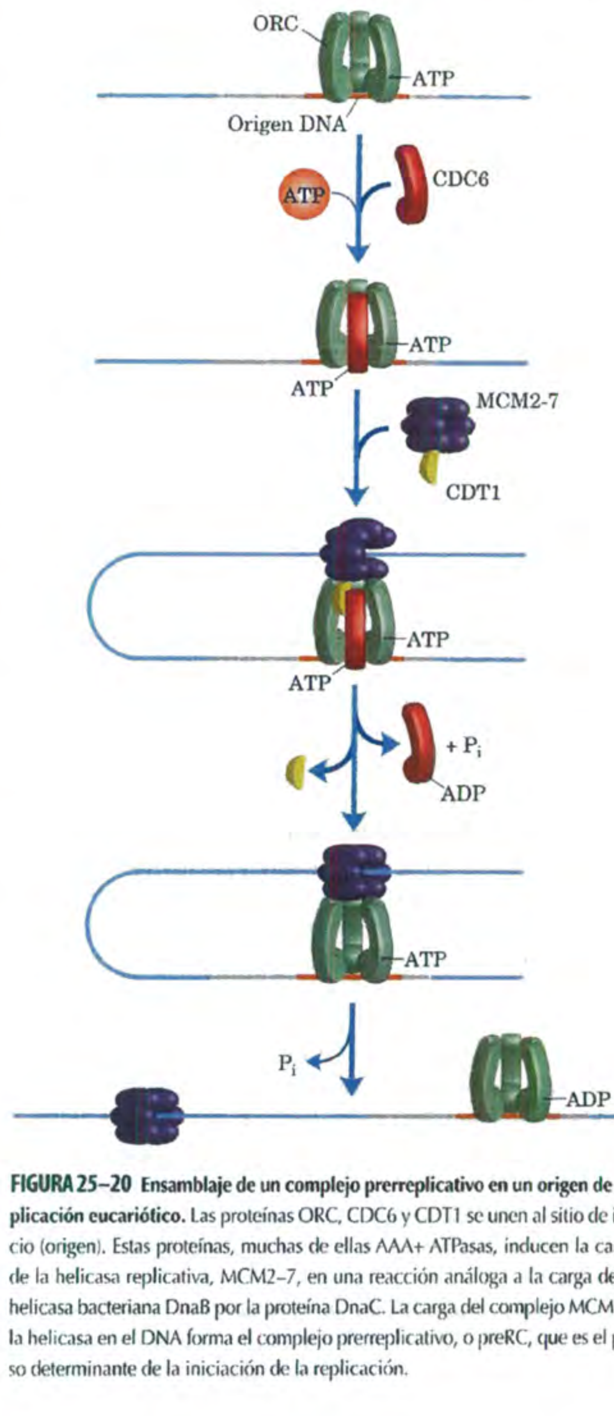


FIGURA 25–20 Ensamblaje de un complejo prerreplicativo en un origen de replicación eucariótico. Las proteínas ORC, CDC6 y CDT1 se unen al sitio de inicio (origen). Estas proteínas, muchas de ellas AAA+ ATPasas, inducen la carga de la helicasa replicativa, MCM2–7, en una reacción análoga a la carga de la helicasa bacteriana DnaB por la proteína DnaC. La carga del complejo MCM de la helicasa en el DNA forma el complejo prerreplicativo, o preRC, que es el paso determinante de la iniciación de la replicación.

CDC10), son también necesarias para cargar el complejo MCM2–7. La CDC6 de levadura es otra AAA+ ATPasa.

El compromiso para la replicación requiere la síntesis y la actividad de complejos de ciclina–CDK en la fase S (tales como el complejo ciclina E–CDK2; véase la Fig. 12–45) y CDC7–DBF4. Ambos tipos de complejos contribuyen a la activación de la replicación, uniéndose y fosforilando varias proteínas en el preRC. Otras ciclinas y CDK inhiben la formación de más complejos preRC una vez ha comenzado la replicación. Por ejemplo, la CDK2 se une a la ciclina A cuando los niveles de ciclina E disminuyen durante la fase S, inhibiendo de esta manera la CDK2 y la formación de nuevos complejos preRC.

La velocidad del movimiento de la horquilla de replicación en los eucariotas (unos 50 nucleótidos/segundo) es sólo una

vigésima parte de la observada en *E. coli*. A esta velocidad, la replicación de un cromosoma humano de tamaño medio que transcurriera a partir de un solo origen tardaría más de 500 horas. La replicación de los cromosomas humanos de hecho tiene lugar de forma bidireccional a partir de múltiples orígenes situados entre 30 y 300 kpb uno de otro. Los cromosomas eucarióticos son casi siempre mucho mayores que los cromosomas bacterianos; la presencia de múltiples orígenes es, pues, muy probablemente una característica general de las células eucarióticas.

Al igual que en las bacterias, en las células eucarióticas hay varios tipos de DNA polimerasas. Algunas se han asociado a funciones especiales tales como la replicación del DNA mitocondrial. En la replicación de los cromosomas nucleares interviene la DNA polimerasa α, en asociación con la DNA polimerasa δ. La **DNA polimerasa α** es típicamente un enzima formado por múltiples subunidades, de estructura y propiedades similares en todas las células eucarióticas. Una de las subunidades tiene actividad primasa y la subunidad mayor (M_r ~180.000) contiene la actividad de polimerización. Sin embargo, esta polimerasa carece de actividad exonucleasa 3′→5′ correctora de pruebas, lo que la hace inadecuada para la síntesis fiel de DNA. La DNA polimerasa α probablemente actúe solamente en la síntesis de cebadores cortos (de DNA o de RNA) para los fragmentos de Okazaki de la hebra rezagada. Estos cebadores son alargados a continuación por la **DNA polimerasa δ.** Este enzima, formado por múltiples subunidades, está asociado a una proteína, que lo estimula, denominada antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA; M_r 29.000), que se encuentra en grandes cantidades en el núcleo de las células en proliferación. La estructura tridimensional del PCNA es sorprendentemente parecida a la de la subunidad β de la DNA polimerasa III de *E. coli* (Fig. 25–10b), aunque la homología de secuencia primaria no sea evidente. La función del PCNA es similar a la de la subunidad β, puesto que forma una abrazadera circular que potencia mucho la procesividad de la polimerasa. La DNA polimerasa δ tiene una actividad exonucleasa 3′→5′ correctora de pruebas y parece ser que realiza la síntesis de las hebras conductora y rezagada formando un complejo análogo al de la DNA polimerasa III dimérica bacteriana.

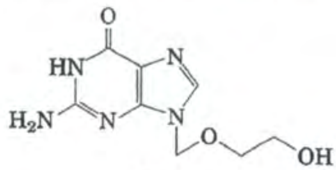
Otra polimerasa, la **DNA polimerasa ε**, puede reemplazar a la DNA polimerasa δ en algunas situaciones, tales como la reparación del DNA. La DNA polimerasa ε puede actuar también en la horquilla de replicación, tal vez con un papel análogo al de la DNA polimerasa I bacteriana, eliminando los cebadores de los fragmentos de Okazaki de la hebra rezagada.

Otros dos complejos proteicos también actúan en la replicación del DNA eucariótico. La RPA (proteína de replicación A) es una proteína eucariótica de unión a DNA de cadena sencilla, equivalente funcionalmente a la proteína SSB de *E. coli*. El RFC (factor de replicación C) es un cargador de abrazadera para PCNA que facilita el ensamblaje de complejos de replicación activos. Las subunidades del complejo RFC tienen una similitud de secuencia significativa con las subunidades del complejo bacteriano (γ) de carga de la abrazadera.

La terminación de la replicación de los cromosomas eucarióticos lineales requiere la síntesis de unas estructuras especiales denominadas **telómeros** en los extremos de cada cromosoma, que serán estudiadas en el siguiente capítulo.

Las DNA polimerasas víricas son dianas de las terapias antivíricas

Muchos virus de DNA codifican sus propias DNA polimerasas, algunas de las cuales se han convertido en dianas farmacológicas. Por ejemplo, la DNA polimerasa del virus hérpex simple es inhibida por aciclovir, un compuesto desarrollado por Gertrude Elion (p. 894). El aciclovir consiste en una guanina unida a un anillo incompleto de ribosa.



Aciclovir

Se fosforila por una timidina quinasa codificada por el virus; el aciclovir se une a este enzima vírico con una afinidad 200 veces mayor que a la timidina quinasa celular. Ello garantiza que la fosforilación tenga lugar principalmente en las células infectadas por el virus. Las quinasas celulares convierten el aciclo-GMP resultante en aciclo-GTP, que es a la vez sustrato e inhibidor de las DNA polimerasas; el aciclo-GTP inhibe competitivamente la DNA polimerasa del hérpex más fuertemente que las DNA polimerasas celulares. Al carecer de 3′ hidroxilo, el aciclo-GTP también actúa de terminador de la cadena cuando se incorpora al DNA. La replicación del virus es, pues, inhibida en diferentes etapas. ■

RESUMEN 25.1 Replicación del DNA

- La replicación del DNA tiene lugar con gran fidelidad en un momento definido del ciclo celular. La replicación es semiconservadora; cada hebra actúa de molde para una nueva hebra hija. Tiene lugar en tres fases diferenciables: inicio, elongación y terminación. La reacción comienza en un origen único en las bacterias y generalmente avanza bidireccionalmente.
- El DNA es sintetizado en dirección 5′→3′ por las DNA polimerasas. En la horquilla de replicación, la hebra conductora se sintetiza continuamente en la misma dirección que el movimiento de la horquilla de replicación; la hebra rezagada se sintetiza de forma discontinua en fragmentos de Okazaki, que son posteriormente unidos.
- La fidelidad de la replicación del DNA depende de (1) la selección de bases por la polimerasa, (2) una actividad exonucleasa 5′→3′ correctora de pruebas que forma parte de la mayoría de polimerasas y (3) mecanismos específicos de reparación para los desapareamientos dejados atrás por la replicación.
- La mayoría de células tienen varias DNA polimerasas. En *E. coli*, la DNA polimerasa III es el enzima de replicación principal. La DNA polimerasa I desempeña funciones durante la replicación, la recombinación y la reparación.
- Las fases separadas de inicio, elongación y terminación de la replicación del DNA ponen en juego un conjunto de enzimas y factores proteicos, muchos pertenecientes a la familia de la AAA+ ATPasa.

- Las proteínas de la replicación bacteriana están organizadas en factorías replicativas, en las cuales el DNA molde se hace pasar a través de dos replisomas anclados en la membrana plasmática bacteriana.

25.2 Reparación del DNA

Una célula generalmente sólo tiene una o dos copias de DNA genómico. Las proteínas y las moléculas de RNA pueden ser reemplazadas rápidamente en caso de resultar dañadas utilizando información codificada en el DNA; en cambio, las propias moléculas de DNA son irreemplazables. El mantenimiento de la integridad de la información contenida en el DNA es, por tanto, un imperativo celular, al que responde un elaborado conjunto de sistemas de reparación de DNA. El DNA puede resultar dañado por diversos procesos, algunos espontáneos, otros catalizados por agentes ambientales (Capítulo 8). La propia replicación puede ocasionalmente dañar la información genética contenida al dejar bases mal apareadas (tal como G apareada con T).

La química de las lesiones del DNA es compleja y diversa. La respuesta celular a las lesiones consiste en una amplia gama de sistemas enzimáticos que catalizan algunas de las transformaciones químicas más interesantes del metabolismo del DNA. En primer lugar, examinaremos los efectos de las alteraciones en la secuencia del DNA y, a continuación, describiremos algunos sistemas de reparación específicos.

Las mutaciones están relacionadas con el cáncer

La mejor manera de ilustrar la importancia de la reparación del DNA es considerar los efectos de una lesión del DNA *no reparada*. La consecuencia más importante es un cambio en la secuencia de bases del DNA, que si se replica y transmite a las generaciones futuras se hace permanente. Un cambio permanente de la secuencia de nucleótidos del DNA se denomina **mutación.** Las mutaciones pueden consistir en la sustitución de un par de bases por otro (mutación por sustitución) o la adición o eliminación de uno o más pares de bases (mutaciones por inserción y deleción). Si la mutación afecta a DNA no esencial o si tiene un efecto inapreciable en la función de un gen, se denomina **mutación silenciosa.** Las mutaciones raramente confieren ventajas biológicas. No obstante, la mayoría de las mutaciones no silenciosas son neutras o deletéreas.

En los mamíferos hay una fuerte correlación entre la acumulación de mutaciones y el cáncer. Un sencillo ensayo desarrollado por Bruce Ames mide el potencial de un determinado compuesto químico para producir mutaciones fácilmente detectables en una cepa bacteriana especializada **(Fig. 25–21)**. Pocos de los productos químicos con que estamos en contacto aparecen como mutagénicos en esta prueba. Sin embargo, de los compuestos reconocidos como carcinogénicos en pruebas exhaustivas en animales, más del 90% son también mutagénicos en la prueba de Ames. Debido a esta importante correlación entre mutagénesis y carcinogénesis, la prueba de Ames para mutágenos bacterianos se utiliza ampliamente como forma de rastreo rápida y barata de potenciales carcinógenos humanos.

El genoma de una célula típica de mamífero acumula muchos millares de lesiones en un período de 24 horas. No obstante, gracias a la reparación del DNA menos de una lesión de cada 1.000 se transforma en una mutación. El DNA es una molécula relativamente estable, pero sin sistemas de reparación el efecto acumulativo de muchas reacciones poco frecuentes pero dañinas haría que la vida no fuese posible. ■

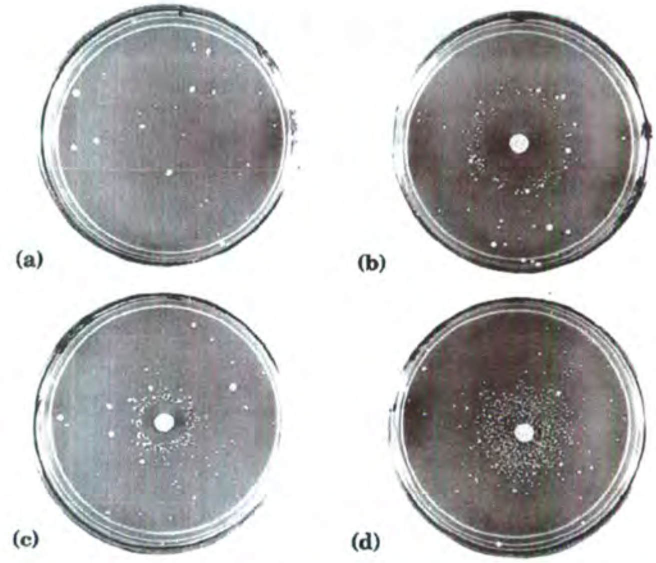


FIGURA 25–21 Prueba de Ames para carcinógenos basada en su mutagenicidad. Se siembran células de una cepa de *Salmonella typhimurium* con una mutación que inactiva un enzima de la ruta biosintética de la histidina en un medio de cultivo sin histidina. Pocas células pueden crecer en este medio. **(a)** Las pequeñas y escasas colonias de *S. typhimurium* que crecen en un medio sin histidina poseen retromutaciones espontáneas que permiten operar a la ruta biosíntetica de la histidina. Se inoculan tres placas con el mismo medio de cultivo **(b)**, **(c)** y **(d)** con un número igual de células. Se coloca en cada placa un disco de papel de filtro que contiene concentraciones progresivamente decrecientes de un mutágeno. El mutágeno aumenta considerablemente la tasa de retromutación y, en consecuencia, el número de colonias. Las áreas claras alrededor del papel de filtro muestran que allí la concentración de mutágeno es tan elevada que es letal para las células. A medida que el mutágeno difunde desde el papel de filtro, se diluye hasta concentraciones subletales que inducen la retromutación. Los mutágenos pueden compararse por su efecto sobre la tasa de mutación. Debido a que muchos compuestos experimentan una serie de transformaciones químicas cuando penetran en las células, a veces se prueba la mutagenicidad de los compuestos después de incubarlos con un extracto de hígado. Algunos compuestos son mutagénicos sólo después de este tratamiento.

Todas las células tienen múltiples sistemas de reparación del DNA

El número y diversidad de los sistemas de reparación refleja a la vez la importancia de la reparación del DNA para la supervivencia de la célula y la variedad de causas que originan las lesiones en el DNA (Tabla 25–5). Algunos tipos de lesiones comunes, tales como los dímeros de pirimidina (véase la Fig. 8–31), pueden ser reparados por varios sistemas diferentes. Muchos procesos de reparación del DNA son extraordinariamente ineficaces en términos energéticos, en franco contraste con la mayoría de rutas metabólicas, donde cada ATP se utiliza de manera óptima y justificada. Cuando está en juego la integridad de la información genética, la cantidad de energía química invertida en un proceso de reparación parece no tener importancia.

TABLA 25–5 Tipos de reparación del DNA en *E. coli*

Enzimas/proteínas	Tipo de lesión
Reparación de apareamientos incorrectos	
Metilasa Dam Proteínas MutH, MutL, MutS DNA helicasa II SSB DNA polimerasa III Exonucleasa I Exonucleasa VII Nucleasa RecJ Exonucleasa X DNA ligasa	Apareamientos incorrectos
Reparación por escisión de base	
DNA glucosilasas Endonucleasas AP DNA polimerasa I DNA ligasa	Bases no habituales (uracilo, hipoxantina, xantina); bases alquiladas; dímeros de pirimidina en algunos otros organismos
Reparación por escisión de nucleótido	
ABC excinucleasa DNA polimerasa I DNA ligasa	Lesiones del DNA que provocan importantes cambios estructurales como dímeros de pirimidina
Reparación directa	
DNA fotoliasas	Dímeros de pirimidina
O^6-Metilguanina-DNA metiltransferasa	O^6-Metilguanina
Proteína AlkB	1-Metilguanina, 3-metilcitosina

La reparación del DNA es posible en gran parte debido a que la molécula de DNA consta de dos cadenas complementarias. La lesión del DNA en una cadena puede ser eliminada y reemplazada de forma precisa, usando de molde la cadena complementaria no dañada. A continuación consideraremos los tipos principales de sistemas de reparación, empezando con aquellos que reparan los escasos apareamientos de nucleótidos incorrectos que quedan después de la replicación.

Reparación de apareamientos incorrectos La corrección de los poquísimos apareamientos incorrectos después de la replicación en *E. coli* mejora la fidelidad de la replicación en un factor de 10^2 a 10^3. Los apareamientos incorrectos se corrigen casi siempre de acuerdo con la información contenida en la cadena vieja (molde); por ello el sistema tiene que ser capaz de discriminar de algún modo entre la cadena molde y la recién sintetizada. La célula logra este objetivo marcando el DNA molde con grupos metilo. El sistema de reparación de apareamientos incorrectos en *E. coli* consta de al menos doce componentes proteicos (Tabla 25–5), que funcionan en la discriminación de las hebras o bien en el propio proceso de reparación.

El mecanismo de discriminación de las hebras de la mayoría de bacterias y eucariotas es desconocido, pero se conoce bien en *E. coli* y algunas bacterias relacionadas. En estas bacterias, la discriminación de hebra se basa en la acción de la meti-

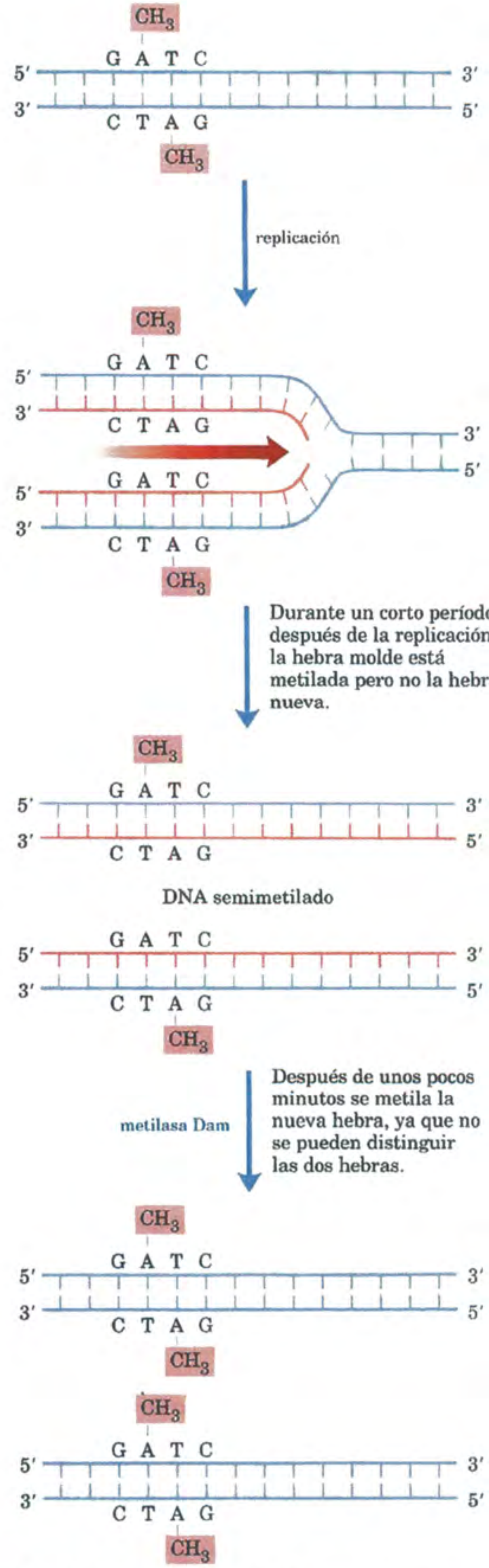


FIGURA 25–22 Metilación y reparación de apareamientos incorrectos. La metilación de cadenas de DNA puede servir para distinguir las hebras parentales (molde) de las hebras recién sintetizadas en el DNA de *E. coli*, capacidad imprescindible para la reparación de apareamientos incorrectos (véase la Fig. 25–23). La metilación tiene lugar en el N^6 de las adeninas en las secuencias (5′)GATC. Esta secuencia es un palíndromo (véase la Fig. 8–18), presente en orientaciones opuestas en ambas cadenas.

lasa Dam, que, como se recordará, metila el DNA en la posición N^6 de todas las adeninas presentes en las secuencias (5′) GATC. Inmediatamente después del paso de la horquilla de replicación, hay un corto período de tiempo (unos pocos segundos o minutos) durante el cual la hebra molde está metilada mientras que la cadena recién sintetizada todavía no lo está **(Fig. 25–22)**. El estado transitorio sin metilar de las secuencias GATC de la cadena recién sintetizada permite distinguir entre la hebra nueva y la hebra molde.

Los apareamientos incorrectos de la replicación en la vecindad de una secuencia GATC semimetilada se reparan seguidamente de acuerdo con la información contenida en la hebra parental (molde) metilada. Experimentos in vitro muestran que son pocos los apareamientos incorrectos reparados si ambas hebras están metiladas en la secuencia GATC. Si ninguna de las dos hebras está metilada, hay reparación, pero ninguna de las dos hebras está favorecida. Este sistema de reparación de apareamientos incorrectos dirigido por metilación repara correctamente los errores a una distancia de hasta 1.000 pb de una secuencia GATC semimetilada.

¿Cómo dirigen el proceso de reparación de apareamientos incorrectos las secuencias GATC relativamente distantes? En la **Figura 25–23** se muestra un posible mecanismo. La proteína MutL forma un complejo con la proteína MutS y el complejo se une a todos los pares de bases mal apareados (excepto C–C). La proteína MutH se une a la proteína MutL y a las secuencias GATC que haya encontrado el complejo MutL-MutS. El paso del DNA a ambos lados del apareamiento incorrecto a través del complejo MutL-MutS forma un lazo de DNA; el paso de ambos extremos del lazo simultáneamente a través del complejo es equivalente al movimiento del complejo en ambas direcciones a la vez a lo largo del DNA. MutH tiene una actividad endonucleasa con especificidad de secuencia, que se mantiene inactiva hasta que el complejo encuentra una secuencia GATC semimetilada. En estos lugares, MutH cataliza el corte de la cadena no metilada por el lado 5′ de la G en GATC, que de este modo marca la hebra que ha de repararse. Los siguientes pasos de la ruta dependen del lugar donde esté situado el apareamiento incorrecto en relación con el sitio de corte **(Fig. 25–24)**.

Cuando el desapareamiento se encuentra en el lado 5′ del sitio de corte (Fig. 25–24, lado derecho), la hebra sin metilar es desenrrollada y degradada en dirección 3′→5′, a partir del sitio de corte hasta más allá del desapareamiento, siendo después reemplazada por nuevo DNA. Este proceso requiere la acción combinada de DNA helicasa II, SSB, exonucleasa I o bien exonucleasa X (ambas degradan las hebras del DNA en dirección 3′→5′), DNA polimerasa III y DNA ligasa. La ruta para la reparación de apareamientos incorrectos en el lado 3′ del sitio de corte es similar (Fig. 25–24, lado izquierdo), excepto que la exonucleasa es reemplazada por la exonucleasa VII (que degrada DNA monocatenario en dirección 5′→3′ o 3′→5′) o por la nucleasa RecJ (una exonucleasa que degrada DNA monohebra en dirección 5′→3′).

La reparación de apareamientos incorrectos es un proceso especialmente costoso en energía para *E. coli*. El apareamiento incorrecto puede estar a 1.000 pb o más de la secuencia GATC. La degradación y sustitución de un segmento de cadena de esta longitud representa una enorme inversión en desoxinucleótidos precursores activados para reparar un *único* apareamiento in-

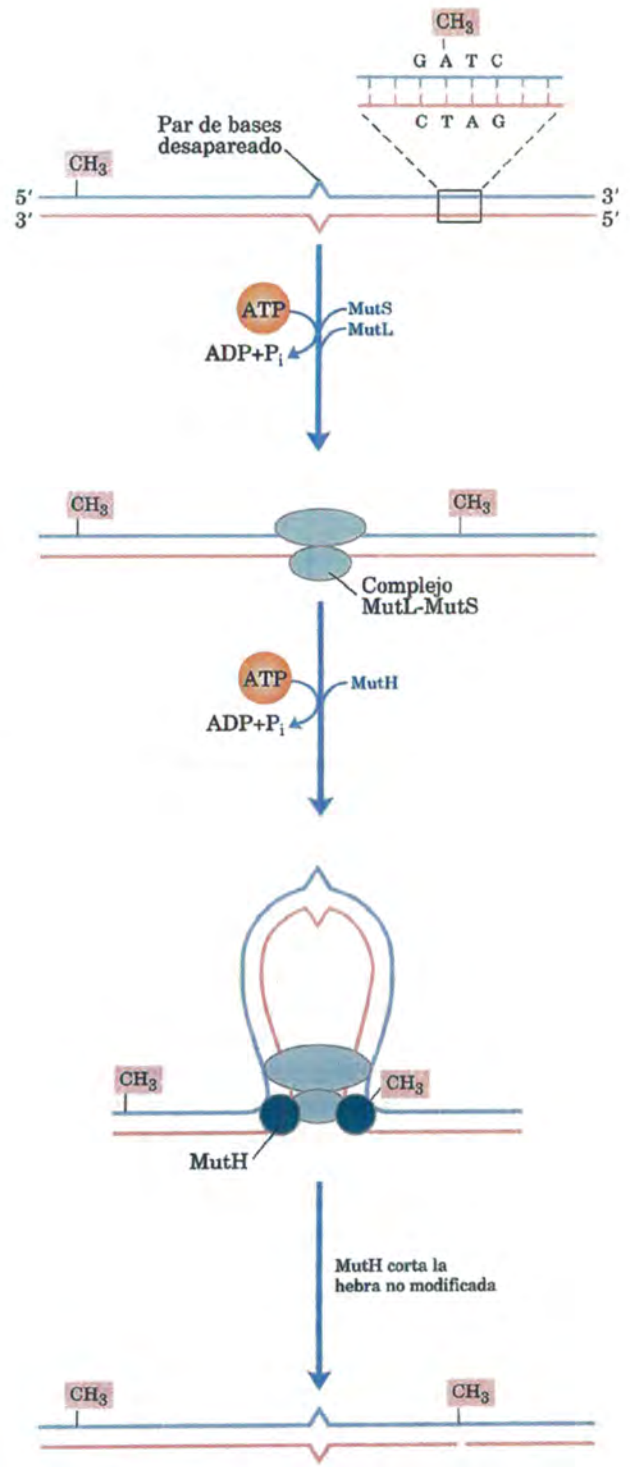


FIGURA 25–23 Modelo para las primeras etapas de la reparación de apareamientos incorrectos dirigida por metilación. Se han purificado las proteínas implicadas en este proceso en *E. coli* (véase la Tabla 25–5). El reconocimiento de la secuencia (5′)GATC y del apareamiento incorrecto son funciones especializadas de las proteínas MutH y MutS, respectivamente. La proteína MutL forma un complejo con MutS en el apareamiento incorrecto. El DNA se hace pasar a través de este complejo, de manera que el complejo se mueve simultáneamente en ambas direcciones a lo largo del DNA hasta que encuentra una proteína MutH unida a una secuencia GATC semimetilada. MutH corta la hebra no metilada en el lado 5′ de la G en la secuencia GATC. Un complejo formado por DNA helicasa II y una de entre varias exonucleasas degrada la hebra del DNA no metilada a partir de este punto hacia el apareamiento incorrecto (véase la Fig. 25–24).

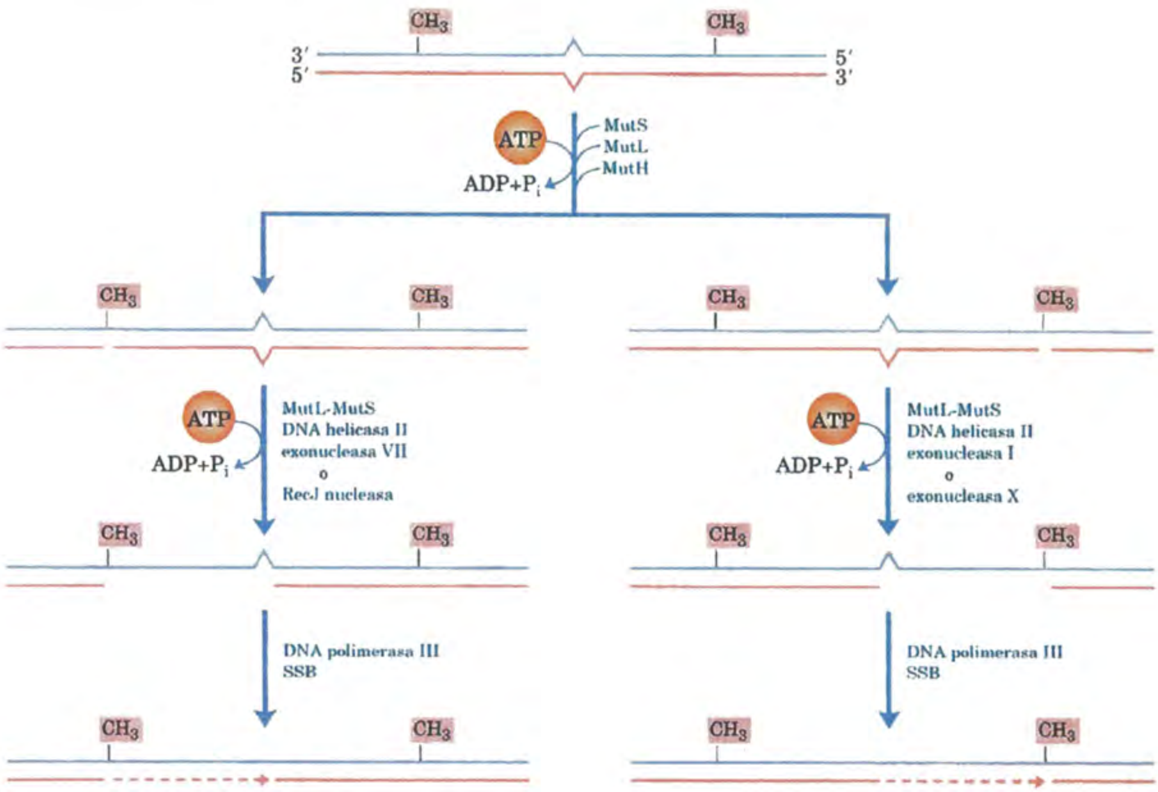


FIGURA 25–24 Finalización de la reparación de apareamientos incorrectos dirigida por metilación. La acción combinada de la DNA helicasa II, la SSB y una de entre cuatro exonucleasas diferentes elimina un segmento de la hebra nueva entre el sitio de corte de MutH y un punto justo más allá del apareamiento incorrecto. La exonucleasa utilizada depende de la localización del lugar de corte en relación con el apareamiento incorrecto tal como se ve con las rutas alternativas mostradas. El hueco resultante es rellenado por la DNA polimerasa III y la mella es sellada por la DNA ligasa (no mostrado).

correcto. Ello demuestra una vez más la importancia del mantenimiento de la integridad genómica de la célula.

Todas las células eucarióticas tienen proteínas estructural y funcionalmente análogas a las proteínas bacterianas MutS y MutL (pero no MutH). Las alteraciones en los genes humanos que codifican proteínas de este tipo causan algunos de los síndromes hereditarios de susceptibilidad al cáncer más comunes (véase el Recuadro 25–1; p. 1003), lo cual constituye una prueba más de la importancia de los sistemas de reparación de DNA para el organismo. Las proteínas homólogas principales de MutS en la mayoría de eucariotas, de las levaduras a los humanos, son MSH2 (*MutS homolog 2*), MSH3 y MSH6. Los heterodímeros de MSH2 y MSH6 se unen generalmente a desapareamientos de un solo par de bases y con menor afinidad a lazos desapareados algo mayores. En muchos organismos, los desapareamientos mayores (de 2 a 6 pb) pueden unirse, en cambio, a un heterodímero de MSH2 y MSH3 o por ambos tipos de heterodímero en tándem. Los homólogos de MutL, principalmente un heterodímero de MLH1 (*MutL homolog 1*) y PMS1 (*post-meiotic segregation*), se unen y estabilizan a los complejos MSH. Muchos detalles de los sucesos posteriores de la reparación de apareamientos incorrectos en los eucariotas están por descubrir. En particular desconocemos el mecanismo de identificación de las hebras de DNA recién sintetizadas, aunque sabemos que la identificación de hebras no usa secuencias GATC.

Reparación por escisión de base Todas las células contienen una clase de enzimas denominados **DNA glucosilasas,** que reconocen lesiones del DNA muy frecuentes (tales como los productos de desaminación de la citosina y la adenina; véase la Fig. 8–30a) y eliminan la base afectada rompiendo el enlace *N*-glucosilo. El corte crea sitios apurínicos o apirimidínicos en el DNA, normalmente conocidos como sitios **sitios AP** o **abásicos.** Cada DNA glucosilasa es generalmente específica para un tipo de lesión.

Las uracilo DNA glucosilasas, por ejemplo, encontradas en la mayoría de células, eliminan específicamente del DNA el uracilo resultante de la desaminación espontánea de la citosina. Las células mutantes que carecen de este enzima tienen una elevada tasa de mutaciones de G≡C a A=T. Esta glucosilasa no elimina el uracilo del RNA o los residuos de timina del DNA. La capacidad de distinguir la timina del producto de desaminación de la citosina (uracilo), que es necesaria para la reparación selectiva de esta última, puede ser una razón que explique por qué el DNA contiene timina en lugar de uracilo (p. 289).

Las bacterias tienen generalmente un solo tipo de uracilo DNA glucosilasa, mientras que los humanos tienen al menos cuatro tipos con diferentes especificidades, indicio de la importancia de la eliminación del uracilo del DNA. La uracil glucosilasa humana más abundante, la UNG, se asocia con el replisoma humano, donde elimina los residuos de U que ocasionalmente se insertan en lugar de la T durante la replicación. La eliminación de los residuos de C es 100 veces más rápida en DNA de cadena sencilla que en DNA de cadena doble, y los humanos poseen el enzima hSMUG1, que elimina cualquier residuo de U que se encuentre en DNA de cadena sencilla durante la replica-

ción y la transcripción. Otras dos DNA glucosilasas humanas, TDG y MBD4, eliminan residuos de U o T apareados con G, generados por desaminación de citosina o 5-metilcitosina, respectivamente.

Otras DNA glucosilasas reconocen y eliminan diversas bases dañadas, tales como la formamidopirimidina y la 8-hidroxiguanina (ambas procedentes de la oxidación de las purinas), la hipoxantina (producto de la desaminación de la adenina) y bases alquiladas, tales como la 3-metiladenina y la 7-metilguanina. En algunos organismos también se han identificado glucosilasas que reconocen otras lesiones, entre ellas los dímeros de pirimidina. Recuérdese que los sitios AP también aparecen como consecuencia de la lenta hidrólisis espontánea de los enlaces *N*-glucosilo del DNA (véase la Fig. 8–30b).

Una vez formado un sitio AP por acción de la DNA glucosilasa, otro tipo de enzimas ha de repararlo. La reparación *no* se realiza simplemente insertando una nueva base y estableciendo de nuevo el enlace *N*-glucosídico. En su lugar, la desoxirribosa 5′-fosfato restante es eliminada y reemplazada por un nuevo nucleótido. Este proceso empieza con enzimas denominados **AP endonucleasas,** que cortan la cadena de DNA que contiene el sitio AP. La posición de la incisión en relación con el sitio AP (5′ o 3′) varía según el tipo de AP endonucleasa. A continuación se elimina un segmento de DNA que contiene el sitio AP, el DNA es reemplazado por la DNA polimerasa I y la mella restante es sellada por la DNA ligasa **(Fig. 25–25)**. En los eucariotas, la sustitución de los nucleótidos corre a cargo de polimerasas especializadas, tal como se describe a continuación.

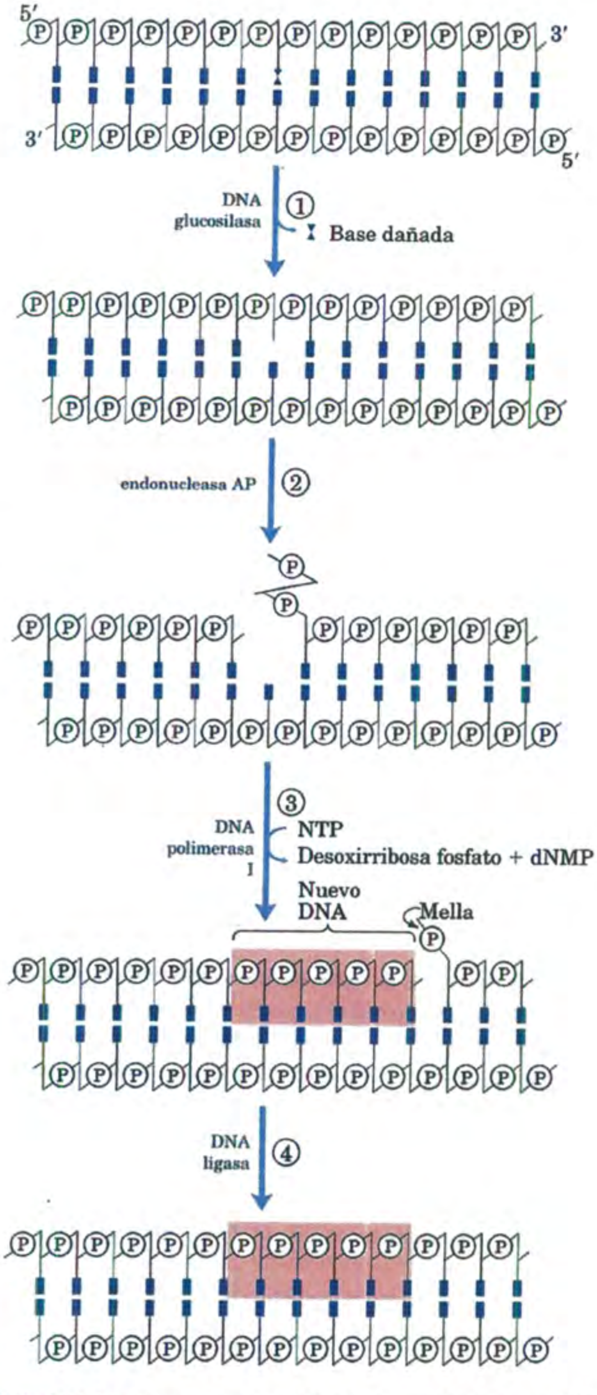


FIGURA 25–25 Reparación mediante la ruta de escisión de bases. ① Una DNA glucosilasa reconoce una base dañada y corta entre la base y la desoxirribosa de la cadena azúcar-fosfato. ② Una AP endonucleasa corta la cadena fosfodiéster cerca del sitio AP. ③ La DNA polimerasa I inicia la síntesis de reparación desde el 3′ hidroxilo libre de la mella, eliminando una porción de la hebra dañada (con su actividad exonucleasa 5′→3′) para después reemplazarla con DNA no dañado. ④ La mella que queda después de disociarse la DNA polimerasa I es sellada por la DNA ligasa.

Reparación por escisión de nucleótido Las lesiones que producen grandes distorsiones en la estructura helicoidal del DNA se reparan mediante el sistema de escisión de nucleótido, una vía de reparación esencial para la supervivencia de todos los organismos de vida libre. En la reparación por escisión de nucleótido **(Fig. 25–26)**, un enzima multimérico (excinucleasa) hidroliza dos enlaces fosfodiéster, uno a cada lado de la distorsión provocada por la lesión. En *E. coli* y otras bacterias, el sistema enzimático hidroliza el quinto enlace fosfodiéster en el lado 3′ y el octavo enlace fosfodiéster en el lado 5′ para generar un fragmento de 12 a 13 nucleótidos (según que la lesión afecte a una o a dos bases). En humanos y otros eucariotas, el sistema enzimático hidroliza el sexto enlace fosfodiéster en el lado 3′ y el vigésimo segundo enlace fosfodiéster en el lado 5′ para generar un fragmento de 27 a 29 nucleótidos. Los oligonucleótidos limitados por las dos incisiones es liberado del dúplex y el hueco resultante es rellenado por la DNA polimerasa I en *E. coli* y por la DNA polimerasa ε en humanos. La mella es reparada por la DNA ligasa.

En *E. coli*, el complejo enzimático clave es la ABC excinucleasa. Está formado por tres subunidades, UvrA (M_r 104.000), UvrB (M_r 78.000) y UvrC (M_r 68.000). El término “excinucleasa” se utiliza para describir la capacidad única de este complejo enzimático para catalizar dos cortes endonucleolíticos específicos, que la distingue de las endonucleasas estándar. Un complejo de las proteínas UvrA y UvrB (A_2B) efectúa un barrido del DNA y se une al lugar de la lesión. A continuación, el dímero de UvrA se disocia, dejando UvrB fuertemente unida al DNA. UvrC se une entonces a UvrB, y ésta realiza una incisión en el quinto enlace fosfodiéster en el lado 3′ de la lesión. Esto es seguido por una incisión efectuada por UvrC en el octavo enlace fosfodiéster en el lado 5′. El fragmento resultante de 12 o 13 nucleótidos es eliminado por la helicasa UvrD. El pequeño hueco así creado es rellenado por la DNA polimerasa I y la DNA ligasa. Esta ruta (Fig. 25–26, izquierda) es la vía principal de reparación de muchos tipos de lesiones, incluidos los dímeros de timina/ciclobu-

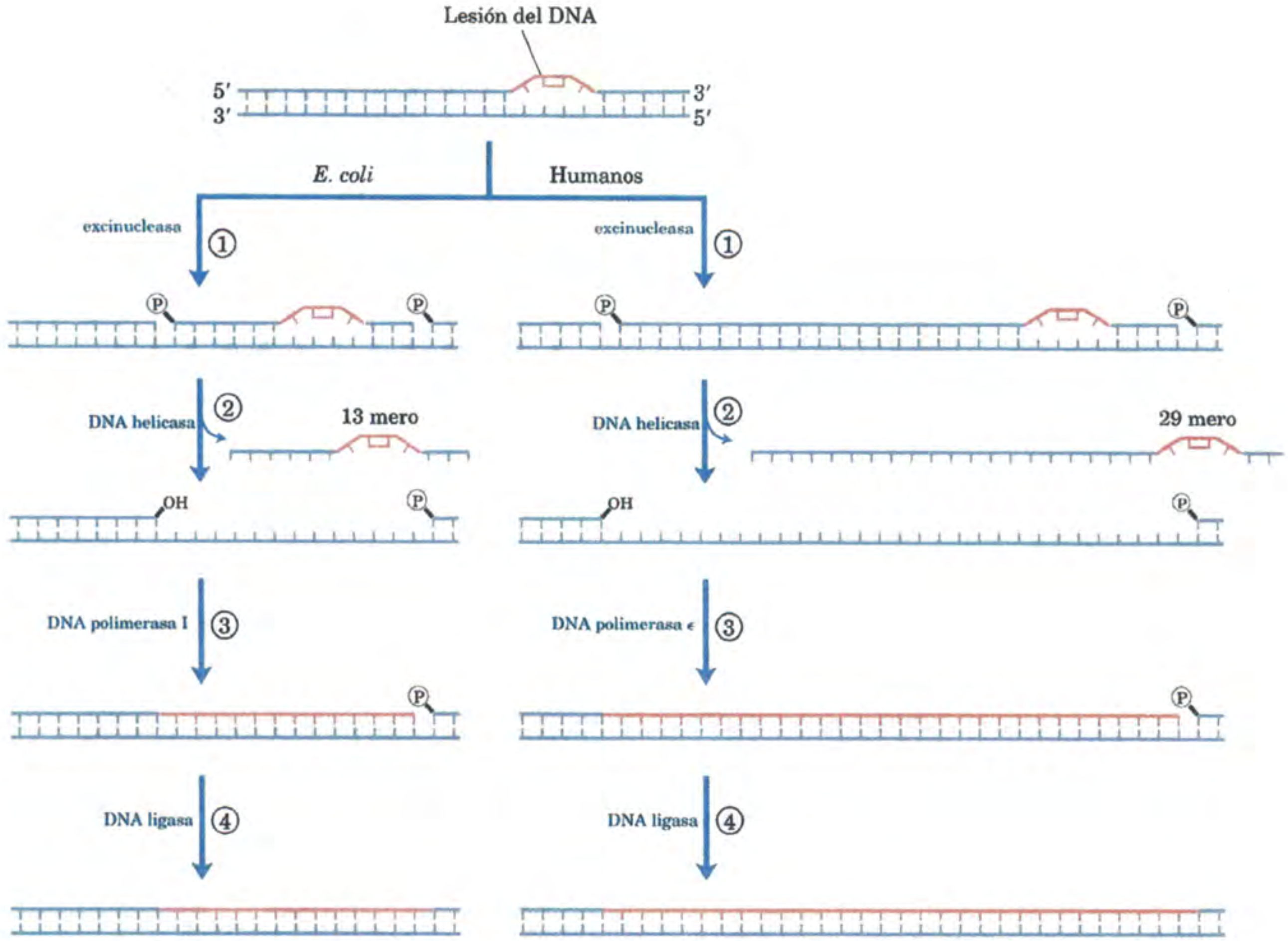


FIGURA 25–26 Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos en *E. coli* y en humanos. La ruta general de reparación por escisión de nucleótidos es similar en todos los organismos. ① Una excinucleasa se une al DNA en los lugares donde hay lesiones de importancia y corta la hebra dañada a ambos lados de la lesión. ② El segmento de DNA, de 13 (13 mero) o de 29 (29 mero) nucleótidos, es eliminado con ayuda de una helicasa. ③ El hueco resultante es rellenado por la DNA polimerasa y ④ la mella restante es sellada por la DNA ligasa.

tano, los fotoproductos 6-4 (véase la Fig. 8–31) y varios tipos de derivados de las bases entre ellos la benzo[*a*]pireno-guanina, que se forma en el DNA por efecto de la exposición al humo de los cigarrillos. La actividad nucleolítica de la ABC excinucleasa es novedosa porque efectúa dos cortes en el DNA.

El mecanismo de las excinucleasas eucarióticas es similar al del enzima bacteriano, aunque son necesarios 16 polipéptidos, que no guardan ningún parecido con las subunidades de la excinucleasa de *E. coli*, para efectuar la doble incisión. Como se describe en el Capítulo 26, algunos de los mecanismos de reparación por escisión de base y de nucleótido en los eucariotas están estrechamente asociados a la transcripción. Las deficiencias genéticas en la reparación por escisión en humanos dan lugar a varias enfermedades graves (véase el Recuadro 25–1).

Reparación directa Varios tipos de lesiones se reparan sin eliminar la base o el nucleótido. El ejemplo mejor caracterizado es la fotorreactivación directa de los dímeros de pirimidina en ciclobutano, una reacción promovida por las **DNA fotoliasas.** Los dímeros de pirimidina son el producto de una reacción inducida por la luz ultravioleta y las fotoliasas utilizan energía proveniente de la luz absorbida para invertir la lesión **(Fig. 25–27)**. Las fotoliasas generalmente contienen dos cofactores que actúan de agentes de absorción de la luz o cromóforos. Uno de los cromóforos es siempre el $FADH^-$. En *E. coli* y en la levadura, el otro cromóforo es un folato. El mecanismo de reacción conlleva la generación de radicales libres. Las DNA fotoliasas no se encuentran en los mamíferos placentarios (lo que incluye los seres humanos).

Pueden encontrarse otros ejemplos en la reparación de lesiones por agentes alquilantes. El nucleótido modificado O^6-metilguanina se forma en presencia de agentes alquilantes, y es una lesión común altamente mutagénica (p. 292), pues tiende a aparearse con timina en lugar de citosina durante la replicación y, por tanto, genera mutaciones de G≡C a A=T **(Fig. 25–28)**. La reparación directa de la O^6-metilguanina la lleva a cabo la O^6-metilguanina-DNA metiltransferasa, que cataliza la transferencia del grupo metilo de la O^6-metilguanina a uno de sus propios residuos de Cys. Esta metiltransferasa no es propiamente un enzima, porque una única transferencia de metilo la metila permanentemente, inactivándola. El consumo de una molécula entera de proteína para corregir una sola base dañada constituye una muestra más de la importancia de mantener la integridad del DNA celular.

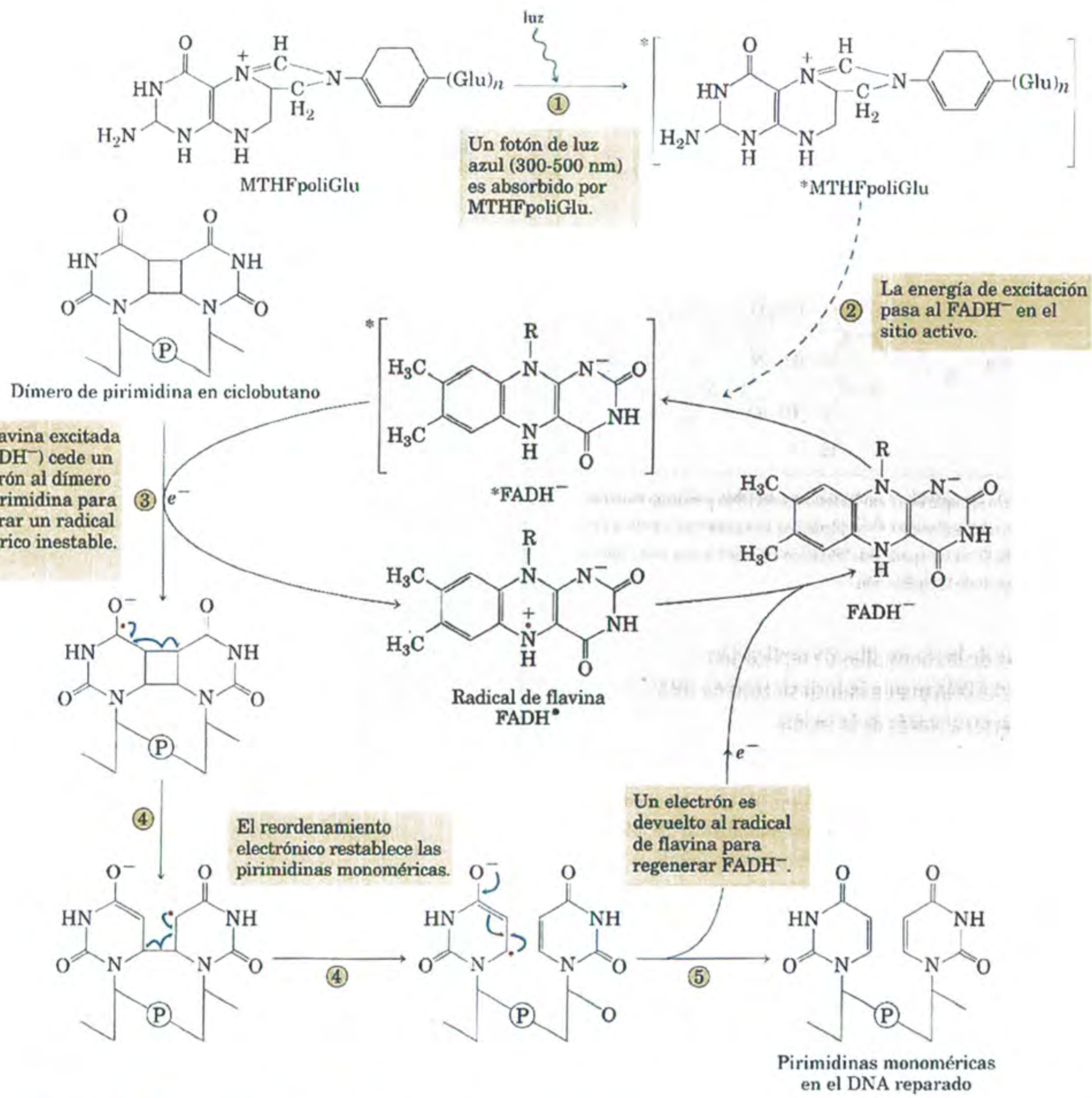
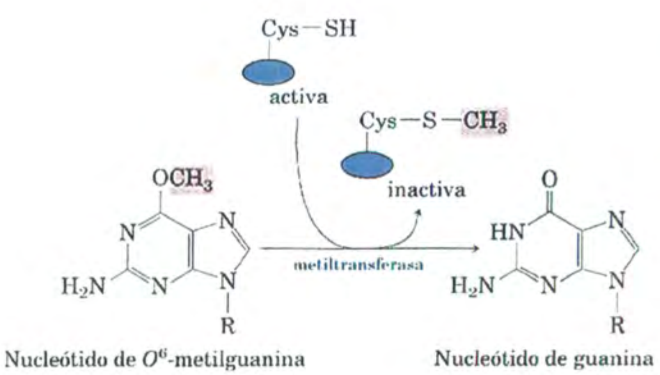
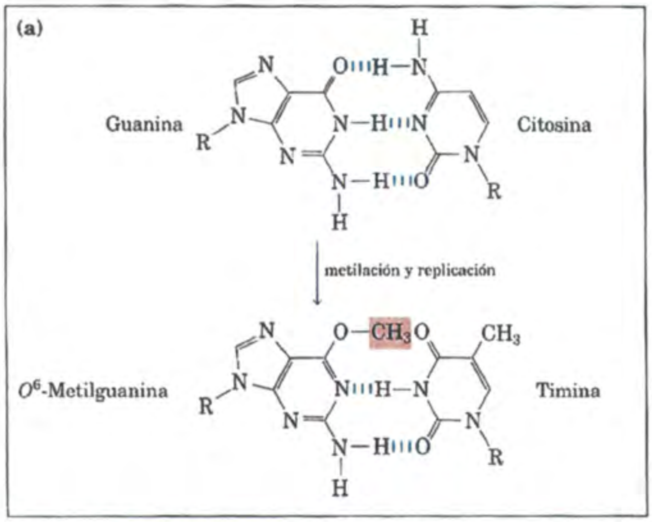


FIGURA DE MECANISMO 25–27 Reparación de dímeros de pirimidina con fotoliasa. La energía obtenida de la luz absorbida se utiliza para invertir la fotorreacción causante de la lesión. Los dos cromóforos de la fotoliasa de *E. coli* (M_r 54.000), N^5,N^{10}-meteniltetrahidrofolilpoliglutamato (MTHFpoliGlu) y FADH⁻, tienen funciones complementarias. MTHFpoliGlu actúa de fotoantena para absorber los fotones de luz azul. La energía de excitación es transferida al FADH⁻ y la flavina excitada (*FADH⁻) cede un electrón al dímero de pirimidina, provocando el reordenamiento mostrado.



Un mecanismo completamente distinto, pero igualmente directo, se utiliza para reparar la 1-metiladenina y la 3-metilcitosina. Los grupos amino de los residuos de A y C se metilan ocasionalmente en el DNA de cadena sencilla y la metilación afecta directamente el correcto apareamiento de las bases. En *E. coli*, la proteína AlkB, miembro de la superfamilia de la dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato-Fe^{2+} **(Fig. 25–29)**, participa en la desmetilación oxidativa de estos nucleótidos alquilados.

Véase el Recuadro 4–3 para una descripción de otro miembro de esta familia enzimática.



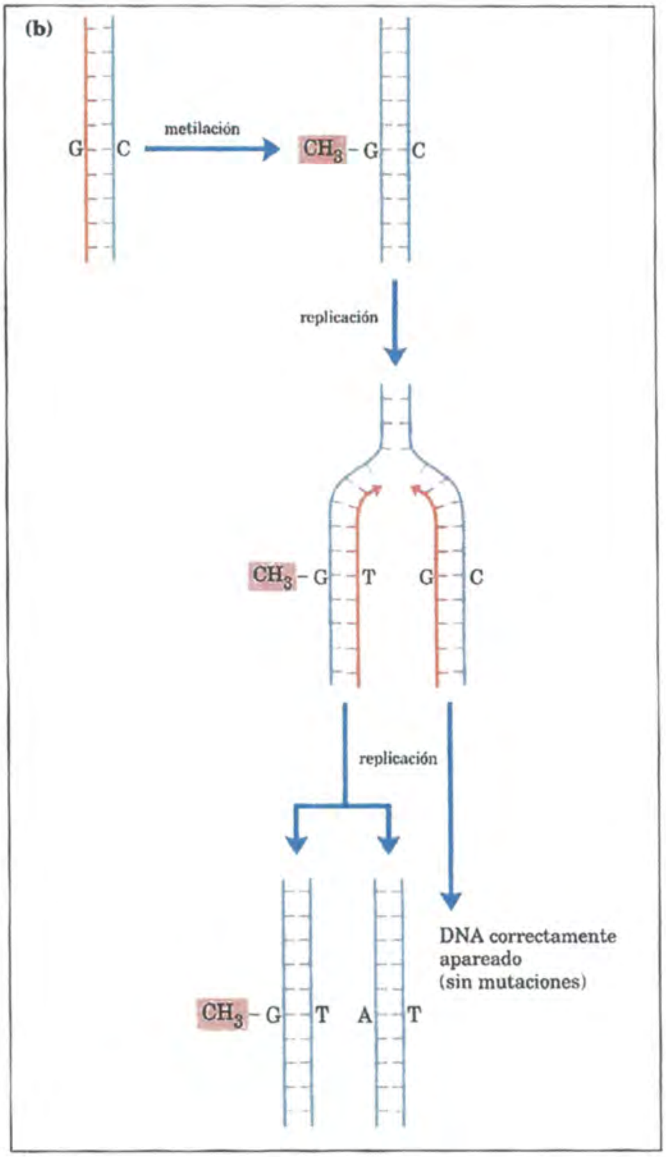
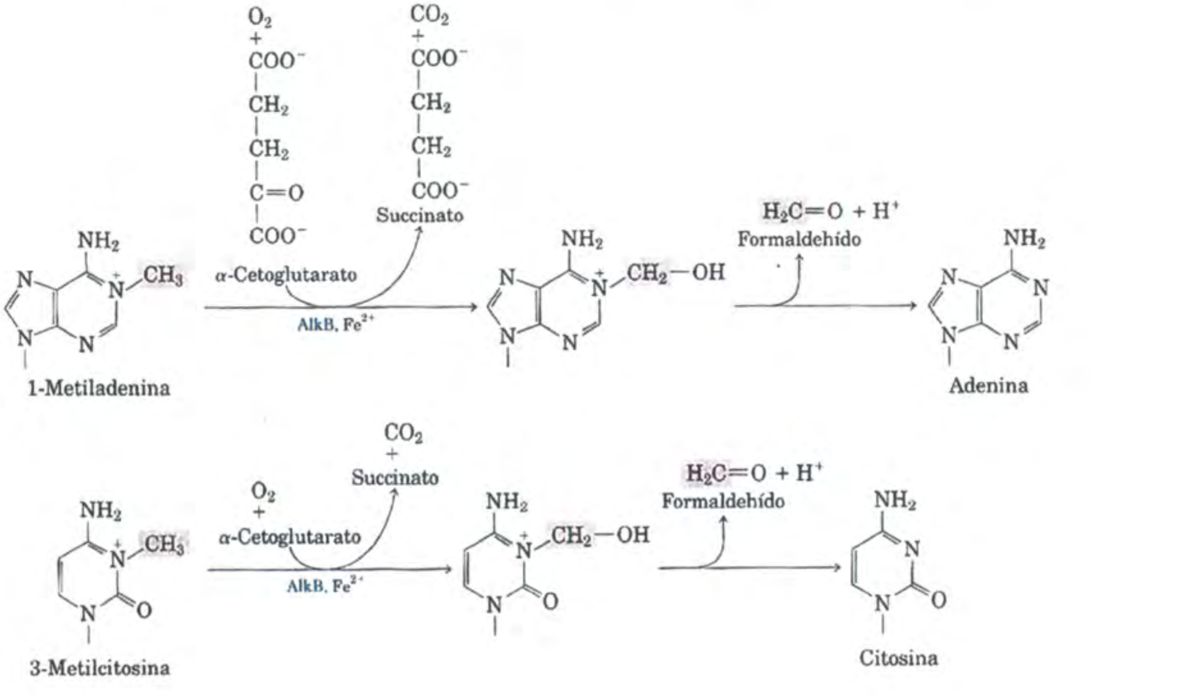


FIGURA 25–28 Un ejemplo de cómo las lesiones del DNA provocan mutaciones. **(a)** El producto de metilación O^6–metilguanina se aparea con la timina y no con la citosina. **(b)** Si no se repara, esta situación conduce a una mutación de G≡C a A=T después de la replicación.

La interacción de las horquillas de replicación con lesiones del DNA puede inducir síntesis de DNA propensa al error a través de la lesión

Las rutas de reparación consideradas hasta este momento por lo general actúan sólo sobre lesiones en DNA de doble cadena; por tanto, la hebra no dañada puede suministrar la información necesaria para restablecer el estado original de la hebra dañada. Pero en ciertos tipos de lesiones, tales como las roturas de doble cadena, los entrecruzamientos de doble cadena o

FIGURA 25–29 Reparación directa de bases alquiladas por AlkB. La proteína AlkB es una dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato-Fe^{2+}. Cataliza la desmetilación oxidativa de los residuos de 1-metiladenina y 3-metilcitosina.



las lesiones en el DNA de cadena sencilla, la hebra complementaria está ella misma dañada o no está disponible. Las roturas de doble cadena y las lesiones en DNA de cadena sencilla aparecen con mayor frecuencia cuando una horquilla de replicación topa con una lesión no reparada **(Fig. 25–30)**. Estas lesiones y los entrecruzamientos del DNA aparecen también por radiaciones ionizantes y reacciones de oxidación.

En una horquilla de replicación bloqueada hay dos posibilidades de reparación. A falta de una segunda hebra que pueda guiar la reparación, la información requerida para una reparación precisa debe proceder de un cromosoma homólogo distinto. El sistema de reparación es, pues, dependiente de la recombinación genética homóloga. La reparación del DNA por recombinación se examina en detalle en la Sección 25.3. En determinadas condiciones se activa una segunda ruta de reparación, conocida como **síntesis de DNA a través de lesión propensa al error** (a menudo abreviada como TLS). Cuando este mecanismo está activado, la reparación del DNA es mucho menos precisa, lo que redunda en una elevada tasa de mutación. En las bacterias la síntesis de DNA a través de lesión propensa al error es parte de la respuesta celular al estrés causado por daños extensos en el DNA y se conoce, adecuadamente, como **respuesta SOS.** Algunas proteínas SOS, tales como la UvrA y la UvrB ya descritas (Tabla 25–6), normalmente están presentes en la célula, pero son inducidas hasta niveles más altos durante la respuesta SOS. Otras proteínas SOS participan en la reparación propensa al error; entre ellas, las proteínas UmuC y UmuD ("Umu" de no mutable; la falta de la actividad génica *umu* elimina la reparación propensa al error). UmuD se corta en un proceso regulado por SOS para dar una forma más corta, denominada UmuD′, que forma un complejo con la proteína UmuC para crear una DNA polimerasa especializada, DNA polimerasa V, que puede replicar a través de muchas lesiones que normalmente bloquearían la replicación. El apareamiento correcto de las bases es a menudo imposible en el sitio de tales lesiones, por lo que este tipo de replicación es propenso al error.

En vista del énfasis que se ha puesto en este capítulo en la integridad del genoma, un sistema que aumenta la tasa de mutación podría parecer incongruente. Sin embargo, es posible concebir este sistema como una estrategia de emergencia desesperada. Los genes *umuC* y *umuD* se inducen plenamente sólo en la respuesta SOS tardía y no son activados para la síntesis a través de las lesiones a menos que los niveles de lesiones en el DNA sean particularmente altos y todas las horquillas de replicación estén bloqueadas. Las mutaciones resultantes de la replicación por la DNA polimerasa V matan muchas células y crean mutaciones deletéreas en otras, pero éste es el precio biológico que un organismo ha de pagar para vencer una barrera, de otro modo infranqueable, para la replicación, y así lograr que sobrevivan al menos unas pocas células hijas mutantes.

Además de la DNA polimerasa V, la replicación a través de lesión requiere la proteína RecA. Los filamentos de RecA unidos a DNA de cadena sencilla en una localización cromosómica pueden activar complejos de DNA polimerasa V unidos a lugares distantes del cromosoma. Este fenómeno se ha llamado acción en "trans" y está facilitado por la formación de un lazo en el cromosoma que aproxima los sitios alejados. Otra polimerasa, la DNA polimerasa IV, es inducida durante la respuesta SOS. La replicación por la DNA polimerasa IV, un producto del gen *din*B, también es muy propensa al error. Las DNA polimerasas bacterianas IV y V pertenecen a una familia de TLS polimerasas presente en todos los organismos. Carecen de actividad exonucleasa correctora de pruebas y la fidelidad en la selección de base puede reducirse en un factor de 10^2, lo que disminuye la fidelidad global en la replicación a un error cada ~1.000 nucleótidos.

Los mamíferos tienen muchas DNA polimerasas de baja fidelidad pertenecientes a la familia TLS. Sin embargo, la presencia de estos enzimas no redunda necesariamente en una tasa de mutación inaceptable, pues muchos de estos enzimas también tienen funciones especializadas en la reparación del DNA. Por ejemplo, la DNA polimerasa η (eta) presente en todos los eucariotas, que promueve la síntesis a través de lesiones como los dímeros T–T de ciclobutano. En este caso se producen pocas mutaciones porque el enzima inserta preferentemente dos residuos de A delante de los dos residuos de T unidos. Otras varias polimerasas de baja fidelidad, entre las que se encuentran las

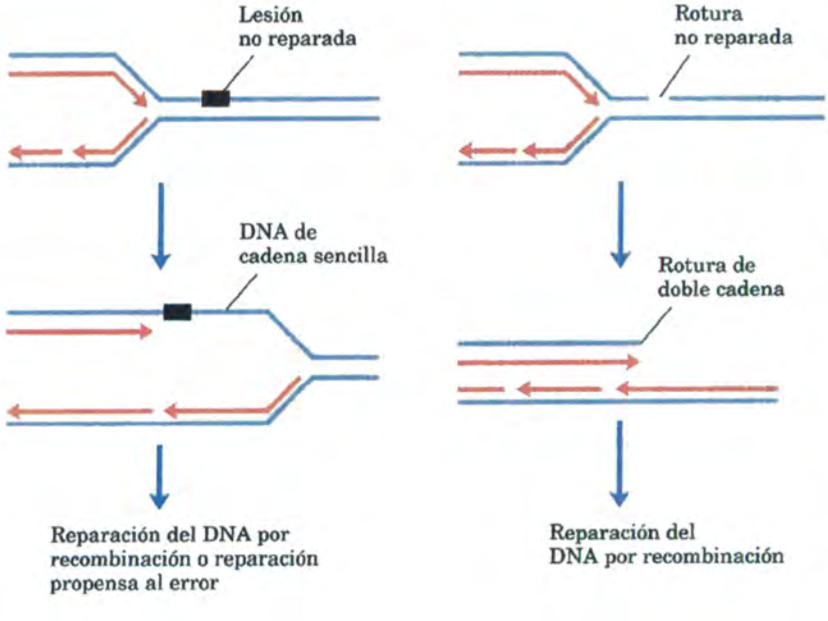


FIGURA 25–30 Efectos de las lesiones del DNA en la replicación. Si la horquilla de replicación encuentra una lesión no reparada o una hebra rota, la replicación se detiene y la horquilla puede colapsarse. Si la lesión queda atrás sin replicar en un segmento monohebra (izquierda) una rotura de cadena sencilla se convierte en una rotura de cadena doble (derecha). En ninguno de estos casos el daño en una hebra puede ser reparado por los mecanismos estudiados antes en este capítulo, porque la hebra complementaria, necesaria para la reparación directa, está dañada o no existe. En estos casos hay dos vías posibles para la reparación: la reparación del DNA por recombinación (descrita en la Fig. 25–39) o, cuando las lesiones son muy numerosas, la replicación propensa al error. Este último mecanismo de reparación utiliza una nueva DNA polimerasa (DNA polimerasa V, codificada por los genes *umuC* y *umuD*), que puede replicar, aunque de forma imprecisa, por encima de muchos tipos de lesiones. Se denomina reparación "propensa al error" porque a menudo provoca mutaciones.

TABLA 25–6 Genes inducidos como parte de la respuesta SOS en *E. coli*

Nombre del gen	Proteína codificada y/o papel en la reparación del DNA
Genes de función conocida	
polB (*dinA*)	Codifica la subunidad polimerizante de la DNA polimerasa II, requerida para el reinicio de la replicación en la reparación del DNA por recombinación
uvrA *uvrB*	Codifican las subunidades UvrA y UvrB de la ABC excinucleasa
umuC *umuD*	Codifican la DNA polimerasa V
sulA	Codifica una proteína que inhibe la división celular, posiblemente para dar tiempo a la reparación del DNA
recA	Codifica la proteína RecA requerida para la reparación propensa al error y para la reparación por recombinación
dinB	Codifica la DNA polimerasa IV
ssb	Codifica la proteína de unión a DNA de hebra sencilla (SSB)
himA	Codifica la subunidad del factor de integración del huésped (IHF), implicado en la recombinación específica de sitio, la replicación, la transposición, la regulación de la expresión génica
Genes que intervienen en el metabolismo del DNA pero cuyo papel en la reparación del DNA es desconocido	
uvrD	Codifica la DNA helicasa II (proteína desenrolladora del DNA)
recN	Necesario para la reparación por recombinación
Genes de función desconocida	
dinD	
dinF	

Nota: Algunos de estos genes y sus funciones se discuten más ampliamente en el Capítulo 28.

DNA polimerasas β, ι (iota) y λ, tienen funciones especializadas en la reparación por escisión de base eucariótica. Todos estos enzimas tienen una actividad 5′-desoxirribosa fosfato liasa, además de la actividad polimerasa. Después de la eliminación de la base por una glucosilasa y el corte del esqueleto por una AP endonucleasa, estas polimerasas eliminan el sitio abásico (un 5′-desoxirribosa fosfato) y llenan el pequeño hueco resultante. La frecuencia de mutaciones debidas a la actividad DNA polimerasa η es reducida a causa de la corta longitud (a menudo un solo nucleótido) de DNA sintetizado.

Lo que surge de las investigaciones sobre los sistemas celulares de reparación de DNA es una imagen en la que el mantenimiento de la integridad genómica consta de múltiples sistemas, a menudo redundantes. En el genoma humano se encuentran más de 130 genes que codifican proteínas implicadas en la reparación del DNA. En muchos casos, la pérdida de función de una de estas proteínas provoca inestabilidad genómica y un aumento de la incidencia de la oncogénesis (Recuadro 25–1). Estos sistemas de reparación están a menudo integrados con los sistemas de replicación del DNA y están complementados con los sistemas de recombinación que examinaremos a continuación.

RESUMEN 25.2 Reparación del DNA

- Las células tienen muchos sistemas de reparación del DNA. La reparación de desapareamientos en *E. coli* está regida por la falta transitoria de metilación de las secuencias (5′) GATC en la hebra recién sintetizada.
- Los sistemas de reparación por escisión de base reconocen y reparan las lesiones causadas por agentes medioambientales (tales como la radiación y los agentes alquilantes) y por reacciones espontáneas de los nucleótidos. Algunos sistemas de reparación reconocen y escinden sólo las bases dañadas o incorrectas, dejando un sitio AP (abásico) en el DNA. Éste es reparado por escisión y reemplazamiento del segmento de DNA que contiene el sitio AP.
- Los sistemas de reparación por escisión de nucleótido reconocen y eliminan diversas lesiones y dímeros de pirimidina. Escinden un segmento de la hebra de DNA que contiene la lesión, dejando un hueco que es rellenado por las actividades DNA polimerasa y ligasa.
- Algunas lesiones del DNA son reparadas por inversión directa de la reacción causante del daño: los dímeros de pirimidina son convertidos en pirimidinas monoméricas por una fotoliasa y el grupo metilo de la O^6-metilguanina es eliminado por una metiltransferasa.
- En las bacterias, la síntesis de DNA a través de lesión propensa al error por TLS DNA polimerasas se produce como respuesta a graves daños en el DNA. En los eucariotas, polimerasas similares tienen funciones especializadas en la reparación del DNA que minimizan la introducción de mutaciones.

RECUADRO 25–1 MEDICINA Reparación del DNA y cáncer

El cáncer humano se desarrolla cuando ciertos genes que regulan la división celular normal (oncogenes y genes supresores de tumores; Capítulo 12) dejan de funcionar, se activan en el momento incorrecto o son alterados. Las células pueden entonces crecer fuera de control y formar un tumor. Los genes que controlan la división celular pueden ser dañados por mutaciones espontáneas o anulados por la invasión de un virus tumoral (Capítulo 26). No es, pues, sorprendente, que las alteraciones de los genes de reparación del DNA, que redundan en un aumento de la tasa de mutación, puedan aumentar considerablemente la susceptibilidad individual al cáncer. Los defectos en los genes que codifican las proteínas implicadas en la reparación por escisión de nucleótidos, la reparación de apareamientos incorrectos y la reparación por recombinación y la síntesis de DNA propensa al error a través de lesión han sido todos ellos asociados con el cáncer humano. Sin duda, la reparación del DNA puede ser un asunto de vida o muerte.

La reparación por escisión de nucleótidos requiere un mayor número de proteínas en el ser humano que en las bacterias, aunque las rutas generales sean muy similares. Los defectos genéticos que inactivan la reparación por escisión de nucleótidos han sido asociados con varias enfermedades genéticas,de las que la mejor estudiada es el xeroderma pigmentosum (XP). La reparación por escisión de nucleótidos es la única ruta para la reparación de los dímeros de pirimidina en el ser humano; por ello, quienes están aquejados de XP son extremadamente sensibles a la luz y desarrollan fácilmente cánceres de piel por exposición a la luz solar. La mayoría de pacientes de XP también presentan anomalías neurológicas, presumiblemente por su incapacidad para reparar ciertas lesiones causadas por la elevada tasa del metabolismo oxidativo de las neuronas. Los defectos en los genes que codifican cualquiera de los al menos siete componentes proteicos diferentes del sistema de reparación por escisión de nucleótido pueden provocar el XP, originando siete grupos genéticos diferentes designados por XPA a XPG. Varias de estas proteínas (en particular XPB, XPD y XPG) también participan en la reparación por escisión de base asociada a la transcripción de lesiones oxidativas, descrita en el Capítulo 26.

La mayoría de microorganismos tienen rutas redundantes para la reparación de los dímeros de pirimidina en ciclobutano, que usan DNA fotoliasa y a veces reparación por escisión de base como alternativas a la reparación por escisión de nucleótidos, pero los humanos y otros mamíferos placentarios no los poseen. La falta de sistemas de apoyo de la reparación por escisión de nucleótido para la eliminación de los dímeros de pirimidina ha planteado la posibilidad que los primeros mamíferos fuesen pequeños, velludos y de hábitos nocturnos, y por tanto con pocas necesidades de reparar daños por luz UV. Sin embargo, los mamíferos sí tienen una ruta para la reparación de los dímeros de pirimidina en ciclobutano a través de la lesión, basado en la DNA polimerasa η. Este enzima inserta preferentemente dos residuos de A en frente del dímero T–T de pirimidina, minimizando así las mutaciones. Los individuos afectados por una dolencia genética caracterizada por la falta de actividad DNA polimerasa η desarrollan una enfermedad del tipo del XP conocida por variante de XP o XP-V. Las manifestaciones clínicas de la XP-V son similares a las del XP clásico, pero con niveles de mutación más altos cuando la piel se expone a la luz UV. Aparentemente, el sistema de reparación por escisión de nucleótido actúa conjuntamente con la DNA polimerasa η en las células humanas normales, reparando o ignorando los dímeros de pirimidina según convenga para mantener el crecimiento celular y la replicación del DNA. La exposición a la luz UV produce un gran número de dímeros de pirimidina que obliga a que algunos sean ignorados por la síntesis a través de la lesión para mantener la replicación en funcionamiento. Las carencias de cualquiera de los dos sistemas son compensadas en parte por el otro. La pérdida de actividad DNA polimerasa η provoca el bloqueo de las horquillas de replicación y obliga a ignorar las lesiones por luz UV, recurriendo a las más mutagénicas polimerasas de síntesis a través de la lesión (TLS). Como sucede cuando otros sistemas de reparación del DNA no son funcionales, el aumento resultante de la tasa de mutación a menudo provoca cáncer.

Uno de los síndromes de susceptibilidad al cáncer más comunes es el cáncer de colon hereditario no formador de pólipos (HNPCC). Este síndrome ha sido relacionado con defectos en la reparación de apareamientos incorrectos. Las células eucarióticas, entre ellas las humanas, poseen muchas proteínas análogas a la bacterianas MutL y MutS (véase la Fig. 25–23). Defectos en al menos cinco genes de reparación de apareamientos incorrectos pueden causar HNPCC. Los más abundantes afectan a los genes *hMLH1* (homólogo 1 humano de MutL) y *hMSH2* (homólogo 2 humano de MutL). En los individuos con HNPCC, el cáncer generalmente se desarrolla a una edad temprana, con elevada incidencia de cánceres de colon.

La mayoría de cánceres de mama afectan a mujeres sin predisposición conocida. Sin embargo, aproximadamente un 10% de los casos están asociados a defectos hereditarios en dos genes, *BRCA1* y *BRCA2*. BRCA1 y BRCA2 son proteínas de gran tamaño (la BRCA1 y la BRCA2 humanas tienen 1.834 y 3.418 aminoácidos, respectivamente). Ambas interaccionan con otras muchas proteínas implicadas en la transcripción, el mantenimiento de los cromosomas, la reparación del DNA y el control del ciclo celular. BRCA2 parece intervenir en la reparación del DNA por recombinación de roturas de doble cadena. Sin embargo, la función molecular precisa de BRCA1 y BRCA2 en estos diversos procesos celulares todavía no está clara. Las mujeres con defectos en *BRCA1* o en *BRCA2* tienen una probabilidad superior al 80% de desarrollar cáncer de mama.

25.3 Recombinación del DNA

El reordenamiento de la información genética dentro y entre moléculas de DNA comprende diversos procesos conocidos conjuntamente como recombinación genética. Las aplicaciones prácticas de los reordenamientos del DNA en la alteración de los genomas de un número creciente de organismos están siendo exploradas (Capítulo 9).

Los procesos de recombinación genética se dividen en al menos tres clases generales. La **recombinación genética homóloga** (o recombinación genética general), consiste en el intercambio genético entre dos moléculas de DNA cualesquiera (o segmentos de la misma molécula) que compartan una región extensa de secuencia casi idéntica. La secuencia concreta de bases es irrelevante, siempre que sea similar en los dos DNA. En la **recombinación específica de sitio** los intercambios sólo tienen lugar en una secuencia de DNA *particular*. La **transposición de DNA** es diferente de las otras dos clases, pues normalmente interviene un segmento corto de DNA con la capacidad de trasladarse de un lugar a otro del cromosoma. Estos "genes saltadores" fueron descubiertos en el maíz en la década de 1940 por Barbara McClintock. Además de estas tres clases bien caracterizadas, hay una amplia gama de reordenamientos genéticos poco frecuentes para los que aún no se ha propuesto ni mecanismo ni finalidad. Nos ceñiremos sólo a las tres clases generales.

Barbara McClintock, 1902–1992

Las funciones de los sistemas de recombinación genética son tan variadas como sus mecanismos. Participan en sistemas de reparación de DNA especializados, actividades especializadas en la replicación del DNA, la regulación de la expresión de ciertos genes, contribuyen a la segregación correcta de los cromosomas durante la división celular en los eucariotas, al mantenimiento de la diversidad genética y a los reordenamientos genéticos programados durante el desarrollo embrionario. En general, la recombinación genética está íntimamente integrada con otros procesos del metabolismo del DNA.

La recombinación genética homóloga tiene diversas funciones

En las bacterias, la recombinación genética homóloga es básicamente un proceso de reparación del DNA y en este contexto se denomina **reparación del DNA por recombinación** (tal como se describe en la Sección 25.2). Actúa en la reconstrucción de horquillas de replicación bloqueadas en las lesiones del DNA. La recombinación genética homóloga puede ocurrir también durante la conjugación bacteriana (apareamiento), cuando el DNA cromosómico es transferido de una célula (donante) a otra (receptora). La recombinación durante la conjugación, aunque rara en las poblaciones bacterianas salvajes, contribuye a la diversidad genética.

En los eucariotas, la recombinación genética homóloga puede desempeñar diversos papeles en la replicación y en la división celular, entre los que se encuentra la reparación de horquillas de replicación bloqueadas. La recombinación ocurre con la máxima frecuencia durante la **meiosis (Fig. 25–31)**,

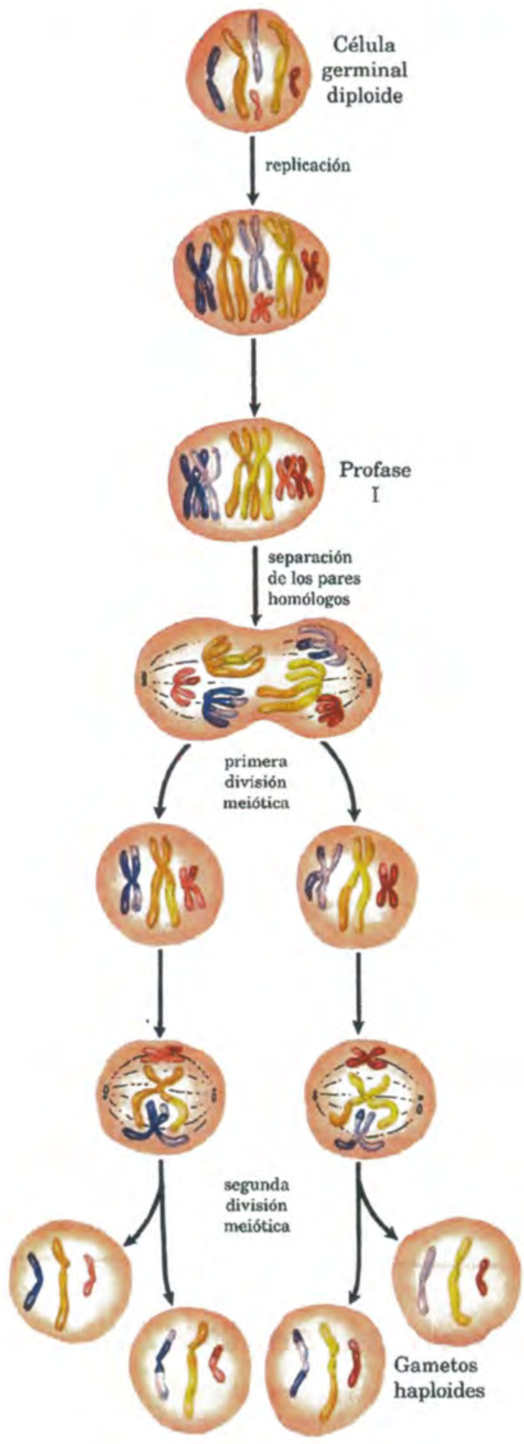


FIGURA 25–31 Meiosis en células germinales de animales. Los cromosomas de una hipotética célula germinal diploide (seis cromosomas; tres pares homólogos) se replican y se mantienen unidos por sus centrómeros. Las moléculas de DNA replicadas se denominan cromátidas (cromátidas hermanas). En la profase I, inmediatamente antes de la primera división meiótica, los tres conjuntos homólogos de cromátidas se alinean formando tétradas, unidas por enlaces covalentes en uniones homólogas (quiasmas). Los entrecruzamientos ocurren dentro de los quiasmas (véase la Fig. 25–32). Estas asociaciones transitorias entre homólogos contribuyen a la segregación correcta de los dos cromosomas unidos hacia los polos opuestos en el paso siguiente, cuando los pares homólogos se separan y migran hacia polos opuestos de la célula en la primera división meiótica. Los productos de esta división son dos células hijas, cada una con tres pares de cromátidas. Los pares homólogos se alinean en el ecuador de la célula como preparación para la separación de las cromátidas (que ahora se denominan cromosomas). La segunda división meiótica produce cuatro células hijas haploides, que pueden servir de gametos. Cada una tiene tres cromosomas, la mitad de los que tiene la célula germinal diploide. Los cromosomas se han vuelto a separar y se han recombinado.

proceso mediante el cual una célula germinal diploide que tiene dos conjuntos de cromosomas se divide para producir gametos haploides (células espermáticas u óvulos) en animales (esporas haploides en plantas), cada uno de los cuales sólo tiene un miembro de cada pareja de cromosomas. La meiosis empieza con la replicación del DNA en las células germinales, de modo que cada célula contiene cuatro copias de las moléculas de DNA. La célula experimenta seguidamente dos divisiones celulares sucesivas sin que se produzca replicación del DNA, lo cual reduce el contenido de DNA de los gametos hasta el nivel haploide.

Después de la replicación del DNA durante la profase de la primera división meiótica, las cromátidas hermanas resultantes permanecen asociadas a sus centrómeros. En esta fase, cada conjunto de cuatro cromosomas homólogos (tétrada) se presenta como dos pares de cromátidas. La información genética es ahora intercambiada entre las cromátidas homólogas estrechamente asociadas por recombinación genética homóloga, proceso que implica el corte y el empalme del DNA **(Fig. 25–32)**. Este intercambio, denominado también entrecruzamiento, puede ser observado con el microscopio óptico. El entrecruzamiento une los dos pares de cromátidas hermanas en puntos denominados quiasmas.

El entrecruzamiento une efectivamente las cuatro cromátidas homólogas, siendo esta unión esencial para la correcta segregación de los cromosomas en las posteriores divisiones meióticas. El entrecruzamiento no es un proceso enteramente al azar, pues se han detectado lugares con alta probabilidad de entrecruzamiento en muchos cromosomas eucarióticos. Sin embargo, la suposición de que el entrecruzamiento ocurre con igual probabilidad en casi cualquier punto a lo largo de la longitud de dos cromosomas homólogos sigue siendo una aproximación razonable en muchos casos. En esta suposición se basa el cartografiado de los genes. La frecuencia de recombinación homóloga en cualquier región que separe dos puntos de un cromosoma es aproximadamente proporcional a la distancia entre los puntos, lo cual permite determinar las posiciones relativas y las distancias entre diferentes genes.

La recombinación homóloga tiene pues al menos tres funciones conocidas: (1) contribuye a la reparación de varios tipos de lesiones del DNA; (2) en las células eucarióticas, proporciona una unión física transitoria entre las cromátidas que es necesaria para la segregación ordenada de los cromosomas en la primera división celular meiótica, y (3) mejora la diversidad genética de una población.

La recombinación durante la meiosis se inicia en roturas de doble cadena

La ruta probable de la recombinación homóloga durante la meiosis está esquematizada en la **Figura 25–33a**. El modelo tiene cuatro características principales. En primer lugar, los cromosomas homólogos están alineados. Segundo, una exonucleasa amplía una rotura de cadena doble, dejando un fragmento de cadena sencilla con un grupo 3′-hidroxilo libre (paso ①). Tercero, los extremos 3′ libres invaden el DNA dúplex intacto para, acto seguido, producirse la **migración de la ramificación (Fig. 25–34)** y/o la replicación que crean un par de estructuras entrecruzadas, denominadas intermedios de Holliday (Fig. 25–33a, pasos ② a ④). Cuarto, el corte de

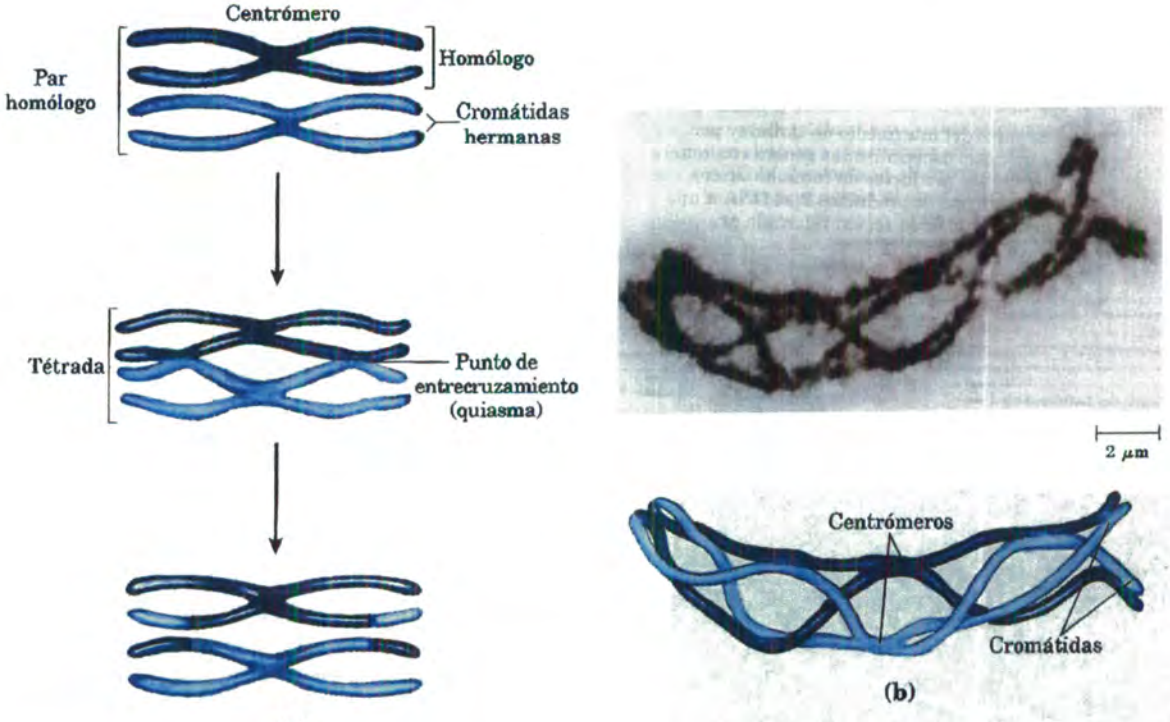
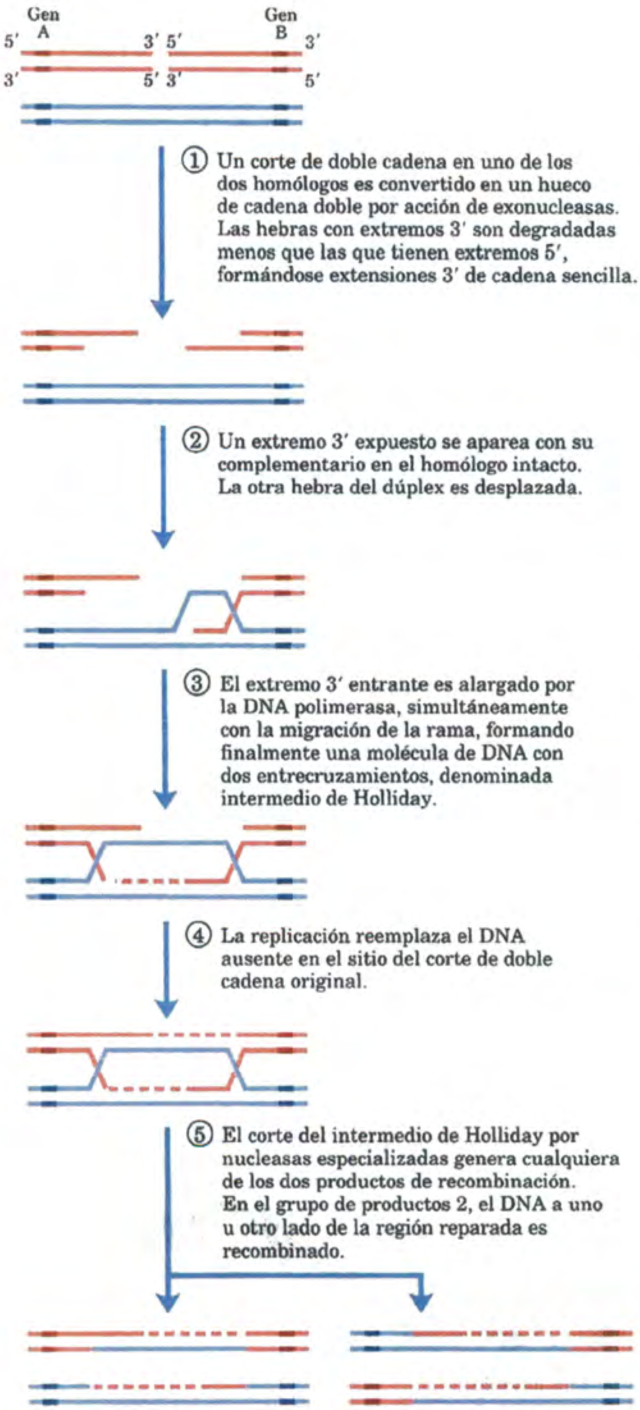


FIGURA 25–32 Entrecruzamiento. **(a)** El entrecruzamiento a menudo da lugar a un intercambio de material genético. **(b)** Se muestran los cromosomas homólogos de un saltamontes durante la profase I de la meiosis. Son evidentes múltiples puntos de unión (quiasmas) entre los dos pares homólogos de cromátidas. Estos quiasmas son la manifestación física de acontecimientos anteriores de recombinación homóloga (entrecruzamientos).



(b)

FIGURA 25–33 Recombinación durante la meiosis. (a) Modelo para la reparación de roturas de doble cadena por recombinación genética homóloga. Los dos cromosomas homólogos (uno en rojo, el otro en azul) implicados en esta recombinación tienen secuencias similares. Cada uno de los dos genes tiene diferentes alelos en los dos cromosomas. Las etapas se describen en el texto. **(b)** Un intermedio de Holliday formado entre dos plásmidos bacterianos in vivo, tal como puede verse en el microscopio electrónico. Estos intermedios deben su nombre a Robin Holliday, quien por primera vez propuso su existencia en 1964.

los dos entrecruzamientos crea dos productos recombinantes completos (paso ⑤).

En este **modelo de reparación de roturas de doble cadena** para la recombinación se usan los extremos 3′ para iniciar el intercambio genético. Una vez éstos se han apareado con la hebra complementaria del homólogo intacto, se crea una región de DNA híbrido que contiene hebras complementarias de dos DNA parentales diferentes (el producto del paso ② de la Fig. 25–33a). Cada uno de los extremos 3′ puede actuar entonces de cebador para la replicación del DNA. Las estructuras así formadas, llamadas **intermedios de Holliday** (Fig. 25–33b), son una característica común de la recombinación genética homóloga en todos los organismos.

Los detalles de la recombinación homóloga pueden variar de una especie a otra, pero la mayor parte de los pasos descritos suelen estar presentes de una u otra forma. Hay dos maneras de cortar o "resolver" el intermedio de Holliday, de manera que los dos productos recombinantes mantengan los genes en el mismo orden lineal que en los sustratos, es decir, los cromosomas originales no recombinados (paso ⑤ de la Fig. 25–33a). Si son cortados de una manera, el DNA que flanquea la región que contiene el DNA híbrido no es recombinada; si son cortados de la otra manera, el DNA flanqueante es recombinado. Ambos resultados son observados in vivo tanto en eucariotas como en bacterias.

La recombinación homóloga, ilustrada en la Figura 25–33, es un proceso muy elaborado con consecuencias moleculares sutiles para la generación de la diversidad genética. Para enten-

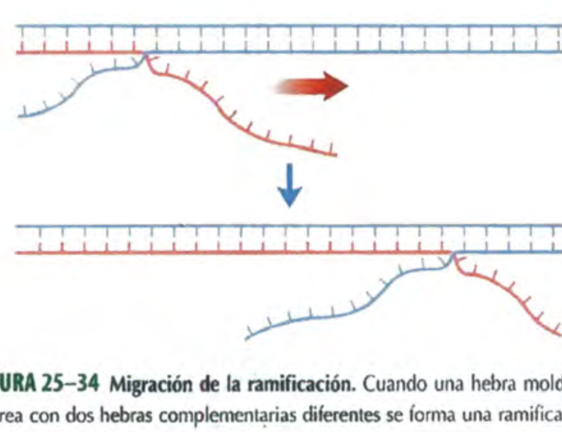


FIGURA 25–34 Migración de la ramificación. Cuando una hebra molde se aparea con dos hebras complementarias diferentes se forma una ramificación en el punto donde se encuentran las tres hebras. La rama "migra" cuando se rompe un par de bases con una de las dos hebras complementarias y es reemplazado por un par de bases con la otra hebra complementaria. En ausencia de un enzima que lo dirija, este proceso puede trasladar la ramificación de forma espontánea en una dirección u otra. La migración de una rama espontánea se detiene siempre que una de las hebras, por lo demás complementarias, tenga una secuencia que no sea idéntica a la otra.

der de qué modo este proceso contribuye a la diversidad genética, es importante observar que los cromosomas homólogos que experimentan la recombinación no son necesariamente *idénticos*.

Las series lineales de genes pueden ser las mismas, pero las secuencias de bases pueden diferir ligeramente en algunos genes (en diferentes alelos). En un individuo, por ejemplo, un cromosoma puede contener el alelo normal de la hemoglobina A (hemoglobina normal), mientras que el otro contiene el alelo de la hemoglobina S (la mutación de la anemia falciforme). La diferencia puede no ser superior a un solo par de bases entre varios millones. La recombinación homóloga no cambia el ordenamiento lineal de los genes, pero puede determinar qué alelos quedan ligados en un único cromosoma y pasan juntos a la siguiente generación.

La recombinación requiere una multitud de enzimas y otras proteínas

Se han aislado algunos de los enzimas, tanto de bacterias como de eucariotas, que catalizan algunas etapas de la recombinación homóloga. En *E. coli* los genes *recB*, *recC* y *recD* codifican el enzima RecBCD, que tiene a la vez actividad helicasa y nucleasa. La proteína RecA promueve todos los pasos básicos del proceso de recombinación homóloga: el apareamiento de dos DNA, la formación de los intermedios de Holliday y la migración de la ramificación (descrita más adelante). Las proteínas RuvA y RuvB (*r*eparación del daño *UV*) forman un complejo que se une a los intermedios de Holliday, desplaza la proteína RecA y promueve la migración de la ramificación a velocidades mayores que RecA. Se han aislado nucleasas de bacterias y levaduras que cortan específicamente los intermedios de Holliday, a menudo denominadas resolvasas. La proteína RuvC es una de las como mínimo dos nucleasas de este tipo de *E. coli*.

El enzima RecBCD se une al DNA lineal en un extremo (roto) y se mueve hacia adentro a lo largo de la doble hélice, desenrollando y degradando el DNA, en una reacción acoplada a la hidrólisis del ATP **(Fig. 25–35)**. Las subunidades RecB y RecD son motores helicasa, con RecB moviéndose en dirección 3'→5' a lo largo de una hebra y RecD moviéndose en la dirección 5'→3' a lo largo de la otra hebra. La actividad del enzima se altera cuando interacciona con una secuencia denominada **chi**, (5')GCTGGTGG. A partir de este punto, la degradación de la hebra con un extremo 3' disminuye considerablemente, pero la degradación de la hebra con el extremo 5' aumenta. Este proceso genera un DNA de cadena sencilla con un extremo 3', estructura que se utiliza en las etapas posteriores de la recombinación (Fig. 25–33). Las 1.009 secuencias *chi* dispersas por todo el genoma de *E. coli* mejoran la frecuencia de recombinación entre 5 y 10 veces hasta una distancia de 1.000 pb del sitio chi. La mejora disminuye a medida que aumenta la distancia al otro sitio. Otras secuencias que aumentan la frecuencia de recombinación han sido identificadas también en otros organismos.

La proteína RecA destaca entre las proteínas que intervienen en el metabolismo del DNA, pues su forma activa es un filamento helicoidal ordenado formado por varios millares de monómeros unidos cooperativamente al DNA **(Fig. 25–36)**. Este filamento normalmente se forma sobre DNA monohebra, tal como el generado por el enzima RecBCD. El filamento también se forma sobre un dúplex de DNA con un hueco de hebra sencilla. En este caso, los primeros monómeros de RecA se fijan al DNA nonohebra en el hueco y a continuación el filamento se extiende rápidamente al dúplex vecino. Varias proteínas, entre las que se encuentran RecX, DinI, RecF, RecO y RecR, regulan el ensamblaje y el desensamblaje de los filamentos de RecA.

Un modelo útil para ilustrar las actividades de recombinación del filamento de RecA es la reacción in vitro de intercambio de hebra **(Fig. 25–37)**. RecA se une primero a un DNA de cadena sencilla para establecer el filamento de nucleoproteína. A continuación, el filamento de RecA incorpora un dúplex de DNA homólogo y lo alinea con la cadena sencilla unida. La unión de ATP (pero no su hidrólisis) es necesaria para la formación de un filamento de RecA activo que pueda alinear dos moléculas

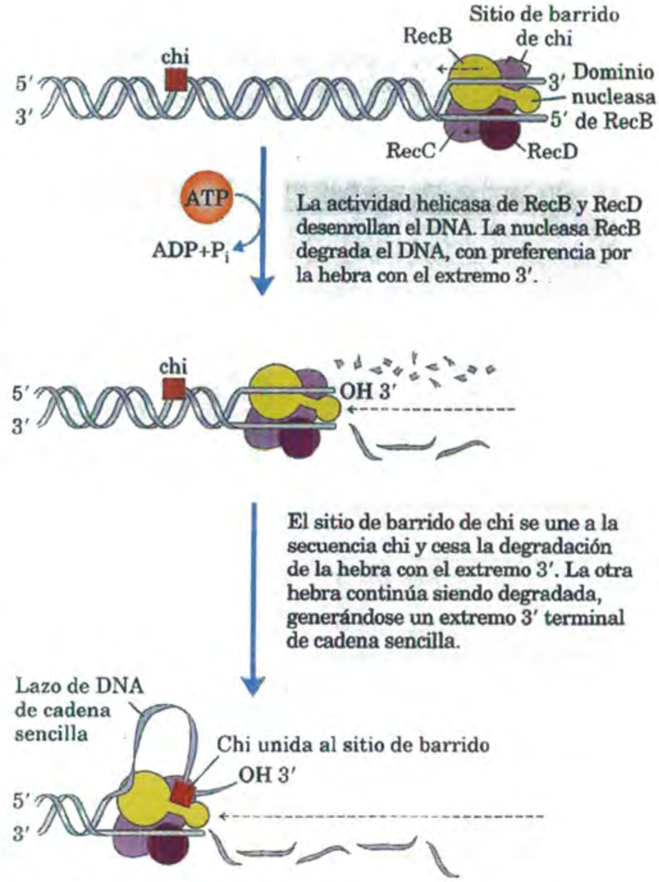


FIGURA 25–35 Actividades helicasa y nucleasa del enzima RecBCD. RecBCD desenrolla y degrada el DNA a partir de un extremo de doble cadena. Un dominio con actividad nucleasa en la subunidad RecB se posiciona de manera que pueda degradar alternativamente ambas hebras del DNA. La subunidad RecB se mueve en dirección 3'→5'en la hebra con el extremo 3' libre usando su actividad helicasa dependiente de ATP. Análogamente, la subunidad RecD se mueve a lo largo de la hebra opuesta en dirección 3'→5'. Los sitios chi son reconocidos y unidos en un sitio de la subunidad RecC. La hebra que contiene la secuencia chi forma un lazo hacia fuera del enzima y sólo la hebra con el extremo 5' libre es ahora accesible al dominio nucleasa de RecB. Se cree que el enzima RecBCD ayuda a iniciar la recombinación genética homóloga en *E. coli*. También está implicado en la reparación de roturas de cadena doble en horquillas de replicación colapsadas

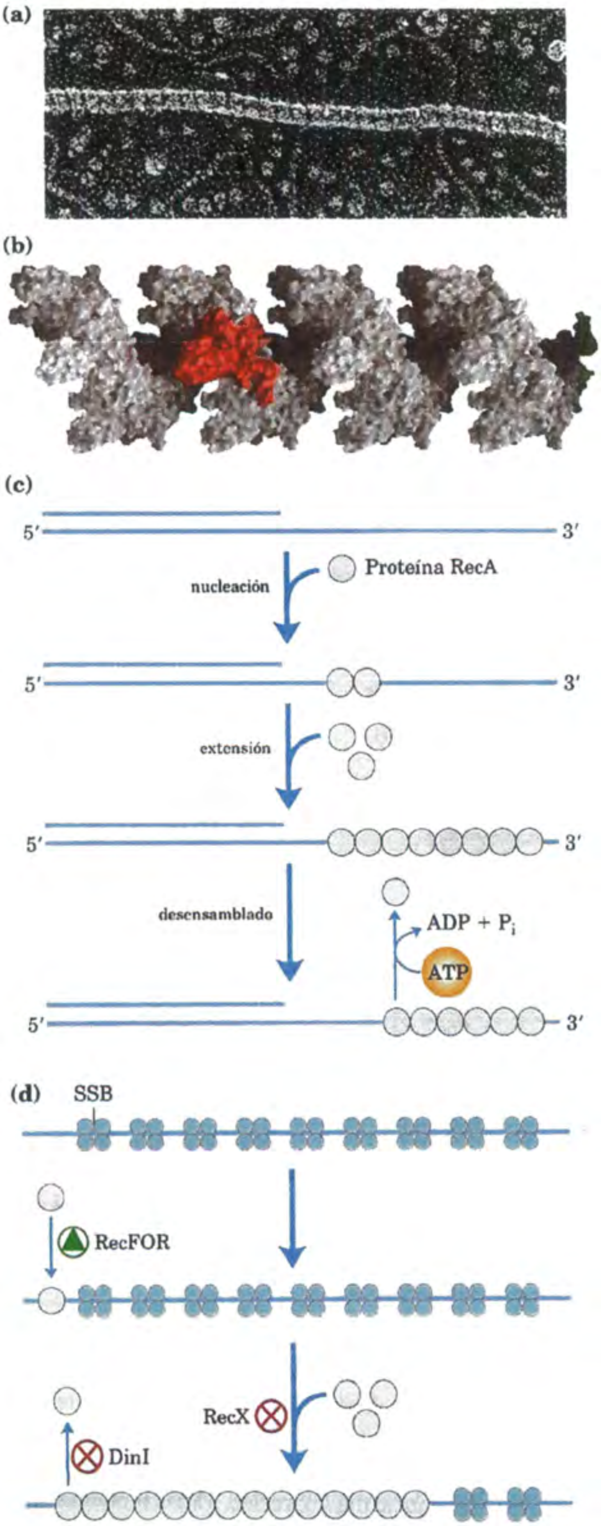


FIGURA 25–36 RecA. **(a)** Filamento nucleoproteico de proteína RecA unida a DNA de cadena sencilla, tal como puede verse en el microscopio electrónico. Las estriaciones ponen de manifiesto la estructura helicoidal dextrógira del filamento. **(b)** Modelo de contorno de superficie de un filamento de RecA de 24 subunidades. El filamento tiene seis subunidades por vuelta. Una de las subunidades se ha coloreado en rojo para proporcionar perspectiva (procedente de PBD ID 2REB). **(c)** Después de un paso limitante de nucleación, los filamentos de RecA se alargan en dirección 5′→3′ sobre el DNA de cadena sencilla. El desensamblado también avanza en dirección 5′→3′, desde el extremo opuesto a la extensión. **(d)** En el ensamblado del filamento colaboran las proteínas RecF, RecO y RecR (RecFOR). La proteína RecX inhibe la extensión del filamento de RecA. La proteína DinI estabiliza los filamentos de RecA, evitando su desensamblaje.

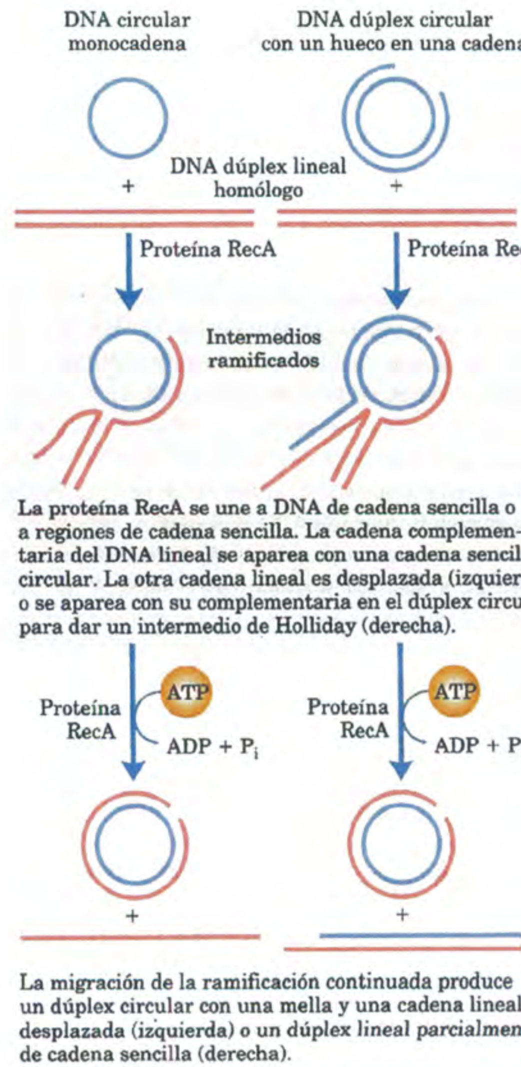


FIGURA 25–37 Reacciones de intercambio de cadena en el DNA promovidas por la proteína RecA in vitro. El intercambio de cadena implica la separación de una cadena de un dúplex de DNA de su complementaria y la transferencia a una cadena complementaria alternativa para formar un nuevo DNA dúplex (heterodúplex). La transferencia forma un intermedio ramificado. La formación del producto final depende de la migración de ramificación facilitada por la proteína RecA. En la reacción pueden intervenir tres cadenas (izquierda) o tener lugar un intercambio recíproco entre dos dúplex homólogos, cuatro cadenas en total (derecha). Cuando están implicadas cuatro cadenas, se forma un intermedio de Holliday. La proteína RecA promueve las fases de migración de ramificación en estas reacciones, utilizando la energía derivada de la hidrólisis del ATP.

de DNA. Las hebras son entonces intercambiadas entre los dos DNA para crear un DNA híbrido. El intercambio tiene lugar a una velocidad de 6 pb/s y avanza en la dirección 5′→3′, en relación al DNA monohebra dentro del filamento de RecA. En esta reacción pueden intervenir tres o cuatro cadenas (Fig. 25–37); en el último caso, durante el proceso se forma un intermedio de Holliday.

A medida que el dúplex de DNA se incorpora al filamento de RecA y se alinea con el DNA de cadena sencilla unido a RecA a lo largo de varios centenares de pares de bases, una de las he-

bras cambia de compañera de apareamiento (**Fig. 25–38**, paso ②). Puesto que el DNA es una estructura helicoidal, el intercambio continuado de hebras requiere la rotación ordenada de los dos DNA alineados. Ello da lugar a un efecto de carrete (pasos ③ y ④), que desplaza el punto de ramificación a lo largo de la hélice. La hidrólisis de ATP está acoplada a las etapas finales del intercambio de hebras de DNA, en las cuales se extiende el híbrido creado en la reacción inicial de apareamiento. El mecanismo de acoplamiento es todavía desconocido.

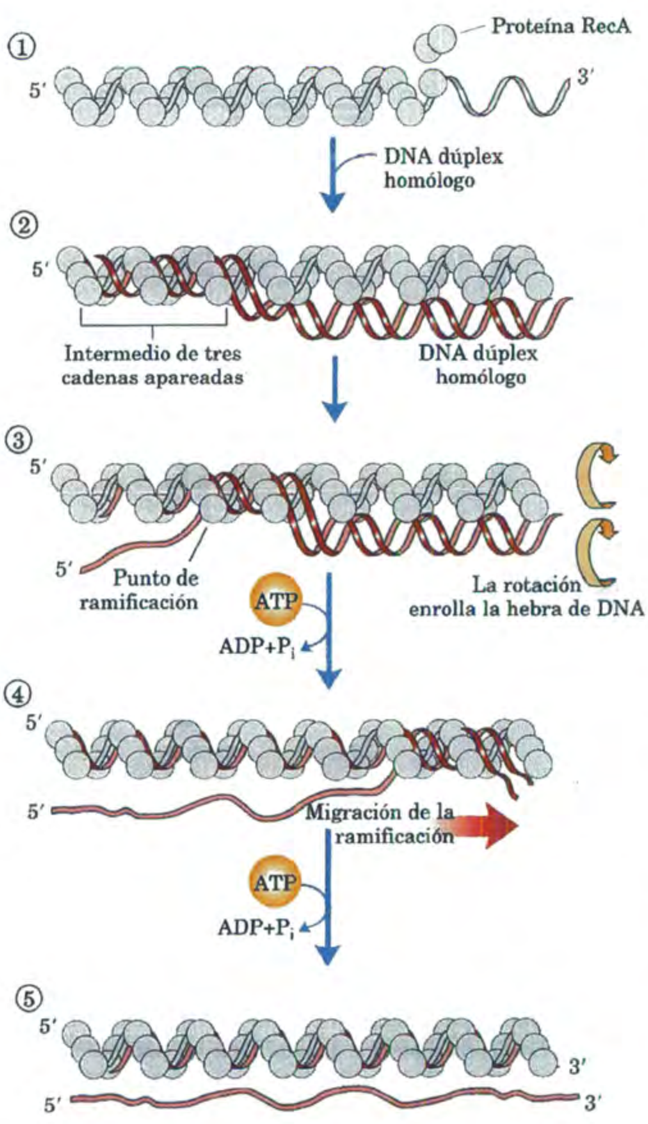


FIGURA 25–38 Modelo de intercambio de cadena en el DNA mediado por la proteína RecA. Se muestra una reacción con tres cadenas. Las bolas que representan la proteína RecA tienen un tamaño inferior al real en relación con el espesor del DNA para clarificar el destino de las hebras del DNA. ① La proteína RecA forma un filamento sobre el DNA de cadena sencilla. ② Un dúplex homólogo se incorpora a este complejo. ③ La rotación del DNA produce un efecto de carrete que desplaza la región de tres cadenas de izquierda a derecha; una de las hebras del dúplex es transferida a la hebra sencilla originalmente unida al filamento. La otra cadena del dúplex es desplazada, y se forma un nuevo dúplex en el filamento. A medida que continúa la rotación (④ y ⑤) la cadena desplazada se separa totalmente. En este modelo, la hidrólisis del ATP por RecA hace girar las dos moléculas de DNA una en torno de la otra y, por tanto, dirige el intercambio de hebras de izquierda a derecha, tal como está representado.

Una vez formado el intermedio de Holliday, hacen falta una multitud de enzimas (topoisomerasas, proteína de migración de la ramificación RuvAB, una resolvasa, otras nucleasas, DNA polimerasa I o III y DNA ligasa), para completar la recombinación. La proteína RuvC (M_r 20.000) de *E. coli* corta los intermedios de Holliday para generar productos cromosómicos completos no ramificados.

Todos los mecanismos del metabolismo del DNA participan en la reparación de las horquillas de replicación bloqueadas

Como todas las células, las bacterias deben afrontar elevados niveles de daño en el DNA, incluso en condiciones normales de crecimiento. La mayoría de las lesiones del DNA son reparadas rápidamente por reparación por escisión de base, reparación por escisión de nucleótido y los demás mecanismos ya descritos. No obstante, casi todas la horquillas de replicación bacterianas topan con una lesión o rotura no reparada en su trayecto desde el origen al término de su recorrido (Fig. 25–30). La DNA polimerasa III no puede superar muchos tipos de lesiones; en estos casos, la DNA polimerasa III no puede avanzar y la lesión suele quedar en un hueco de cadena sencilla. El encuentro con una rotura de la hebra de DNA crea una rotura de doble cadena. Ambas situaciones requieren la reparación por recombinación del DNA (**Fig. 25–39**). En condiciones de crecimiento normal, las horquillas de replicación bloqueadas se reactivan mediante un elaborado sistema de reparación que incluye la reparación por recombinación del DNA, la reanudación de la replicación y la reparación de cualquier lesión que haya quedado atrás. En este proceso participan todos los componentes del metabolismo del DNA.

Una vez la horquilla de replicación se ha detenido, puede ser reactivada a través de al menos dos vías principales; ambas requieren la proteína RecA. La reparación de lesiones que se encuentren en huecos requiere además las proteínas RecF, RecO y RecR. La reparación de roturas de doble cadena requiere el enzima RecBCD (Fig. 25–39). Otras etapas adicionales de recombinación son seguidas por el proceso conocido por **reinicio de la replicación independiente de origen,** en el que la horquilla de replicación se reorganiza con ayuda de un complejo de siete proteínas (PriA, B y C, y DnaB, C, G y T). Este complejo, descubierto inicialmente como un componente necesario para la replicación del DNA de ϕX174 in vitro, se denomina actualmente **primosoma de reinicio de la replicación.** La reactivación de las horquillas de replicación también requiere DNA polimerasa II, con un papel aún no definido, pues acto seguido cede su lugar a la DNA polimerasa III para la replicación extensiva generalmente necesaria para completar el cromosoma. En algunos casos el reinicio de la replicación puede ocurrir más allá de una lesión bloqueante del DNA antes de que la lesión sea reparada.

La reparación de horquillas de replicación bloqueadas supone transiciones coordinadas entre replicación y recombinación. Las etapas de recombinación sirven para rellenar el hueco del DNA o para unir la rama del DNA rota con el fin de recrear la estructura ramificada del DNA en la horquilla de replicación. Las lesiones dejadas atrás, en lo que ya es DNA dúplex, son re-

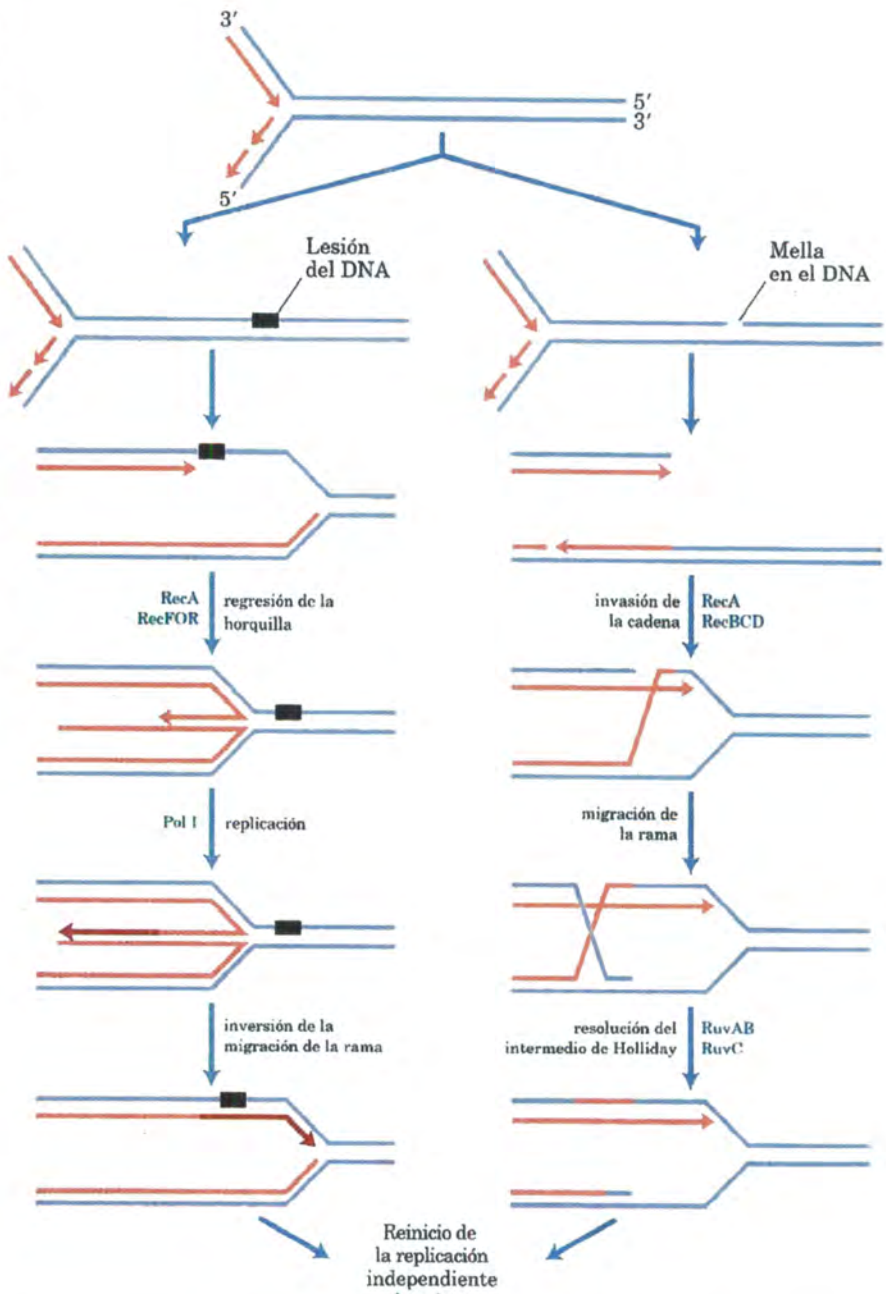


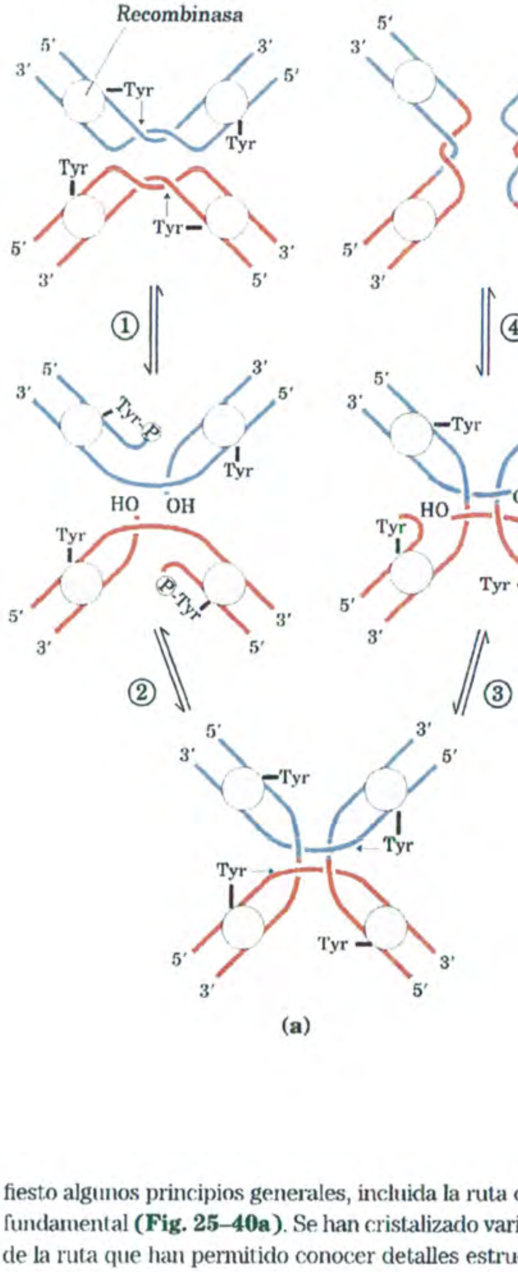
FIGURA 25–39 Modelos para la reparación del DNA por recombinación en horquillas de replicación bloqueadas. La horquilla de replicación se colapsa al encontrar una lesión en el DNA (izquierda) o una rotura de la cadena (derecha). Los enzimas de la recombinación promueven las transferencias de hebra necesarias para reparar la estructura ramificada del DNA en la horquilla de replicación. Una lesión en un hueco de cadena sencilla es reparada en una reacción que requiere las proteínas RecF, RecO y RecR. Las roturas de cadena doble son reparadas en una ruta que requiere el enzima RecBCD. Ambas rutas requieren RecA. Los intermedios de recombinación son procesados por otros enzimas (p.ej., RuvA, RuvB y RuvC, que procesan intermedios de Holliday). Las lesiones en el DNA de doble cadena son reparadas por reparación por escisión de nucleótido u otras rutas. La horquilla de replicación se restablece con ayuda de enzimas que catalizan la reiniciación de la replicación independiente de origen, para así completar la replicación del cromosoma. El proceso en su conjunto requiere una elaborada coordinación de todos los aspectos del metabolismo del DNA bacteriano.

paradas por rutas como la reparación por escisión de base o por escisión de nucleótido. Por lo tanto, una amplia variedad de enzimas implicados en cada uno de los aspectos del metabolismo del DNA desempeñan en último término un papel en la reparación de las horquillas de replicación bloqueadas. Este tipo de proceso de reparación es una de las funciones principales del sistema de recombinación homóloga en cualquier célula y los defectos en la reparación del DNA por recombinación tienen un importante papel en patologías humanas (Recuadro 25–1).

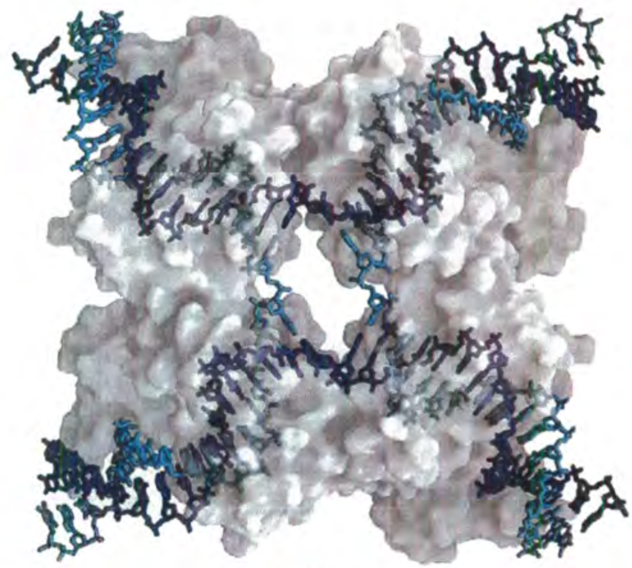
La recombinación específica de sitio produce reordenamientos precisos del DNA

En la recombinación genética homóloga, el tipo que hemos examinado hasta ahora, pueden intervenir dos secuencias homólogas cualesquiera. El segundo tipo general de recombinación, la recombinación específica de sitio, es un proceso muy diferente, pues está limitado a secuencias específicas. Estas reacciones de recombinación tienen lugar en prácticamente todas las células, pero sus funciones están especializadas y varían en gran medida de una especie a otra. Entre estas funciones se encuentran la regulación de la expresión de ciertos genes, la promoción de reordenamientos programados del DNA durante el desarrollo de muchos organismos o los ciclos de replicación de algunos DNA de virus y plásmidos. Todos los sistemas de recombinación específica de sitio requieren un enzima denominado recombinasa y una secuencia única de DNA corta (20 a 200 pb) sobre la que actúa la recombinasa (el sitio de recombinación). Una o más proteínas auxiliares pueden regular el momento o los efectos de la reacción.

Hay dos clases generales de sistemas de recombinación específica de sitio, que dependen de residuos Tyr o Ser en el sitio activo. Los estudios in vitro de muchos sistemas de recombinación específica de sitio de la clase tirosina han puesto de mani-



(a)



(b)

FIGURA 25–40 Una reacción de recombinación específica de sitio. **(a)** La reacción mostrada es para una clase común de recombinasas con especificidad de sitio denominadas recombinasas de la clase integrasa (llamadas así por la integrasa del bacteriófago λ, la primera recombinasa caracterizada). Estos enzimas utilizan residuos de Tyr del sitio activo como nucleófilos. La reacción es llevada a cabo por un tetrámero de subunidades idénticas. Las subunidades de la recombinasa se unen a una secuencia específica, que constituye el sitio de recombinación. ① Una cadena de cada uno de los DNA es cortada en puntos específicos de la secuencia. El nucleófilo es el grupo —OH de un residuo Tyr del sitio activo y el producto es un enlace covalente fosfotirosina entre la proteína y el DNA. ② Las hebras cortadas se unen a otras hebras, formando un intermedio de Holliday. Los pasos ③ y ④ completan la reacción en un proceso similar al de los dos primeros pasos. La secuencia original del sitio de recombinación es regenerada después de recombinar el DNA que flanquea el sitio. Las reacciones tienen lugar en un complejo de múltiples subunidades de recombinasa, que a veces incluye otras proteínas que aquí no se muestran. **(b)** Modelo de contorno de superficie de una recombinasa de cuatro subunidades de la clase integrasa, denominada recombinasa Cre, unida a un intermedio de Holliday (las hélices de las hebras se muestran en azul claro y en azul oscuro). La proteína se representa en transparencia para que el DNA unido sea visible (procedente de PDB ID 3CRX). Otro grupo de recombinasas, denominadas familia resolvasa/invertasa, utilizan un residuo de Ser del sitio activo como nucleófilo.

fiesto algunos principios generales, incluida la ruta de reacción fundamental **(Fig. 25–40a)**. Se han cristalizado varios enzimas de la ruta que han permitido conocer detalles estructurales de la reacción. Una recombinasa independiente reconoce y se une a cada uno de los dos sitios de recombinación en dos moléculas de DNA diferentes o dentro del mismo DNA. Una cadena de DNA de cada sitio se corta en un punto específico dentro del sitio y la recombinasa se une de manera covalente al DNA en el sitio de corte a través de un enlace fosfotirosina (paso ①). El enlace transitorio proteína-DNA preserva el enlace fosfodiéster que se pierde al cortar el DNA, por lo que no son necesarios cofactores de alta energía tales como el ATP en los pasos posteriores. Las hebras de DNA cortadas se vuelven a unir a nuevas cadenas para formar un intermedio de Holliday, con nuevos enlaces fosfodiéster creados a expensas de la unión proteína-DNA (paso ②). Para completar la reacción, el proceso se ha de repetir en un segundo punto dentro de cada uno de los sitios de recombinación (pasos ③ y ④). En los sistemas que emplean un residuo Ser en el sitio activo, las dos hebras de cada sitio de recombinación se cortan conjuntamente y vuelven a unirse a las nuevas hebras sin intermedio de Holliday. En los dos tipos de sistema el intercambio siempre es recíproco y preciso, regenerando los sitios de recombinación una vez completada la reacción. Podemos considerar una recombinasa como una endonucleasa específica de sitio y ligasa en el mismo paquete.

Las secuencias de los sitios de recombinación reconocidas por las recombinasas específicas de sitio son parcialmente asimétricas (no palindrómicas) y los dos sitios de recombinación se alinean con la misma orientación durante la reacción de la recombinasa. El resultado depende de la localización y la orientación de los sitios de recombinación **(Fig. 25–41)**. Si los dos sitios están en la misma molécula de DNA, la reacción da lugar a la deleción o a la inversión del DNA limitado por ellos, según si los sitios tienen la misma orientación u opuesta, respectivamente. Si los sitios están en moléculas de DNA diferentes, la recombinación es intermolecular; si uno de los DNA, o los dos, son circulares se produce una inserción. Algunos sistemas de la re-

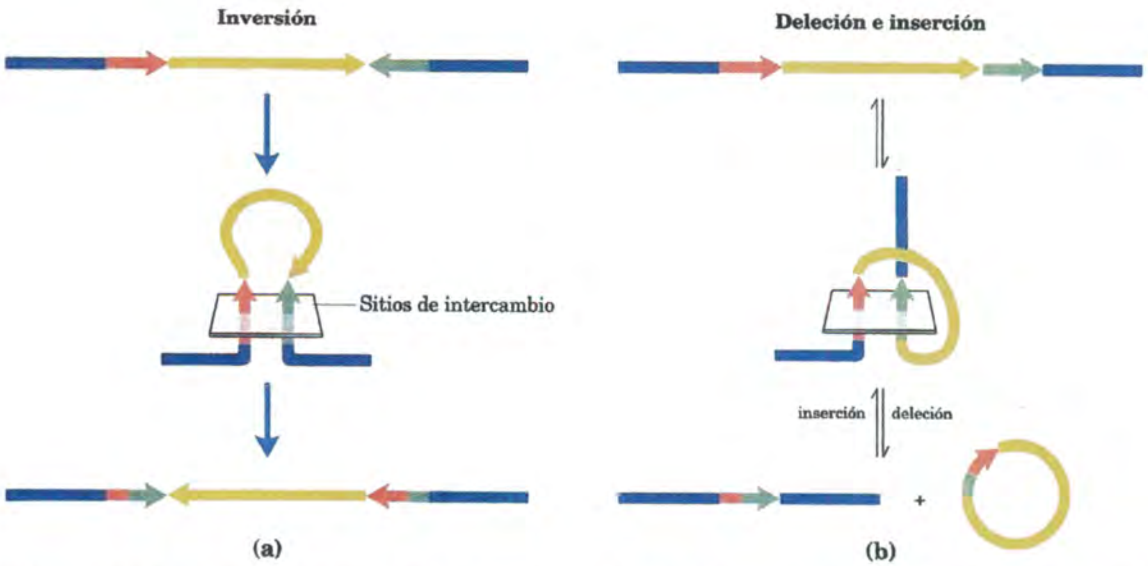


FIGURA 25–41 Resultado de la recombinación específica de sitio. El resultado de la recombinación específica de sitio depende de la localización y de la orientación de los sitios de recombinación (rojo y verde) en una molécula de DNA de doble cadena. La orientación (indicada por flechas) se refiere al orden de los nucleótidos en el sitio de recombinación, no a la dirección 5'→3'. **(a)** Sitios de recombinación con orientaciones opuestas en la misma molécula de DNA. El resultado es una inversión. **(b)** Sitios de recombinación con la misma orientación, sea en una molécula de DNA, produciendo una deleción, sea en dos moléculas de DNA, produciendo una inserción.

combinasa son muy específicos para una de estas reacciones y actúan solamente sobre sitios con la orientación adecuada.

El primer sistema de recombinación específica de sitio estudiado in vitro fue el codificado por el bacteriófago λ. Cuando el DNA del fago λ penetra en una célula de *E. coli*, se produce una compleja serie de procesos reguladores que determinan uno de entre dos destinos del DNA. El DNA de λ se replica y se producen más bacteriófagos (destruyendo la célula huésped) o bien se integra en el cromosoma del huésped (como profago), replicándose pasivamente junto con el cromosoma durante muchas generaciones. La integración es facilitada por una recombinasa de la clase tirosina codificada por el fago (λ integrasa), que actúa en los sitios de recombinación de los DNA del fago y de la bacteria, denominados *att*P y *att*B, respectivamente **(Fig. 25–42)**. El papel de la recombinación específica de sitio en la regulación de la expresión génica se trata en el Capítulo 28.

La recombinación específica de sitio puede ser necesaria para completar la replicación del cromosoma

La reparación del DNA por recombinación del cromosoma circular bacteriano, aunque indispensable, a veces genera productos secundarios dañinos. La resolución de un intermedio de Holliday en una horquilla de replicación por una nucleasa tal como RuvC, seguida por la finalización de la replicación, puede dar lugar a uno de dos productos: los dos cromosomas

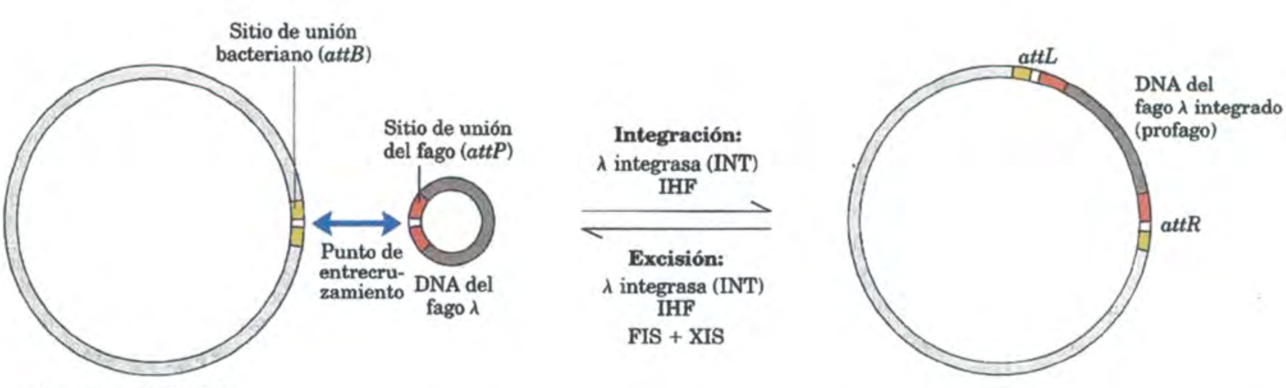


FIGURA 25–42 Integración y escisión del DNA del bacteriófago λ en el sitio diana cromosómico. El sitio de unión del DNA del fago λ (*attP*) comparte solamente 15 pb de homología completa con el sitio bacteriano (*attB*) en la región del entrecruzamiento. La reacción genera dos nuevos sitos de unión (*attR* y *attL*), que flanquean el DNA integrado del fago. La recombinasa es la λ integrasa (o proteína INT). La integración y el corte utilizan diferentes sitios de unión y diferentes proteínas auxiliares. La escisión utiliza las proteínas XIS, codificada por el bacteriófago, y FIS, codificada por la bacteria. Ambas reacciones requieren la proteína IHF (*f*actor de *i*ntegración del *h*uésped), codificada por la bacteria.

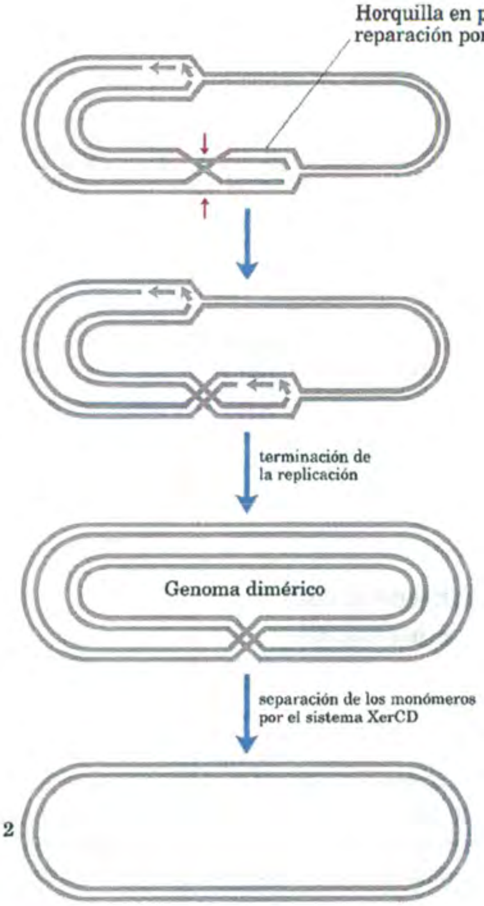


FIGURA 25–43 Deleción de DNA para neutralizar los efectos deletéreos de la reparación del DNA por recombinación. La resolución de un intermedio de Holliday durante la reparación del DNA por recombinación puede (si se corta en los puntos indicados por las flechas rojas) generar un cromosoma dimérico continuo. Una recombinasa especializada específica de sitio de *E. coli*, denominada XerCD, convierte el dímero en monómeros, permitiendo así la segregación de los cromosomas y la reanudación de la división celular.

monoméricos normales o bien un cromosoma dimérico contiguo **(Fig. 25–43)**. En este último caso, los cromosomas unidos covalentemente no pueden segregarse en las células hijas durante la división celular, y las células hijas quedan "pegadas". Un sistema especializado de recombinación específica de sitio de *E. coli*, denominado sistema XerCD, convierte los cromosomas diméricos en cromosomas monoméricos, para que la división celular pueda continuar. La reacción consiste en una deleción específica de sitio (Fig. 25–41b). Éste es otro ejemplo de la estrecha coordinación entre los procesos de recombinación del DNA y otros aspectos del metabolismo del DNA.

Los elementos genéticos transponibles se mueven de un lugar a otro

Ahora examinaremos el tercer sistema general de recombinación: el que permite el movimiento de los elementos transponibles, o **transposones.** Estos segmentos de DNA, presentes en prácticamente todas las células, que se mueven o "saltan" de un lugar del cromosoma (el sitio dador) a otro en el mismo o diferente cromosoma (el sitio receptor). La homología de las secuencias de DNA normalmente no es necesaria para este movimiento, denominado **transposición;** la nueva localización es elegida más o menos al azar. La inserción de un transposón en un gen esencial podría matar la célula, por lo que la transposición está estrechamente regulada y normalmente es muy poco frecuente. Los transposones son tal vez los parásitos moleculares más simples que han logrado replicarse pasivamente dentro del cromosoma de las células huésped. En algunos casos transportan genes que son útiles para la célula huésped, con la que mantienen una especie de simbiosis.

Las bacterias tienen dos tipos de transposones. Las **secuencias de inserción** (transposones simples) contienen solamente las secuencias requeridas para la transposición y los genes para las proteínas (transposasas) que promueven el proceso. Los **transposones complejos** contienen uno o más genes, además de los necesarios para la transposición. Estos genes adicionales pueden, por ejemplo, conferir resistencia a los antibióticos y, por tanto, mejorar las posibilidades de supervivencia de la célula huésped. La diseminación de elementos de resistencia a los antibióticos en las poblaciones bacterianas causantes de enfermedades, que hacen perder eficacia a algunos antibióticos (p. 949), se debe en parte a la transposición. ■

Los transposones bacterianos varían en estructura, pero la mayoría tienen cortas secuencias repetitivas en cada extremo, que sirven de lugares de unión de la transposasa. Cuando ocurre la transposición, una secuencia corta del sitio de inserción (de 5 a 10 pb) se duplica para formar una corta secuencia repetida adicional que flanquea cada extremo del transposón insertado **(Fig. 25–44)**. Estos segmentos duplicados son producidos por el mecanismo de corte responsable de insertar el transposón en una nueva localización del DNA.

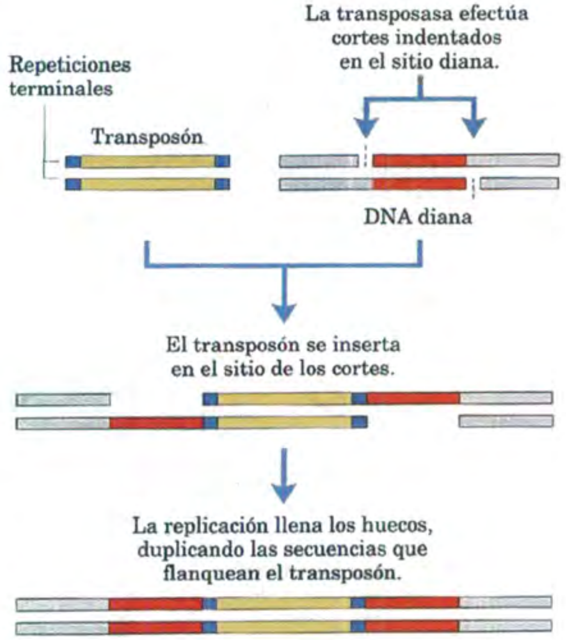
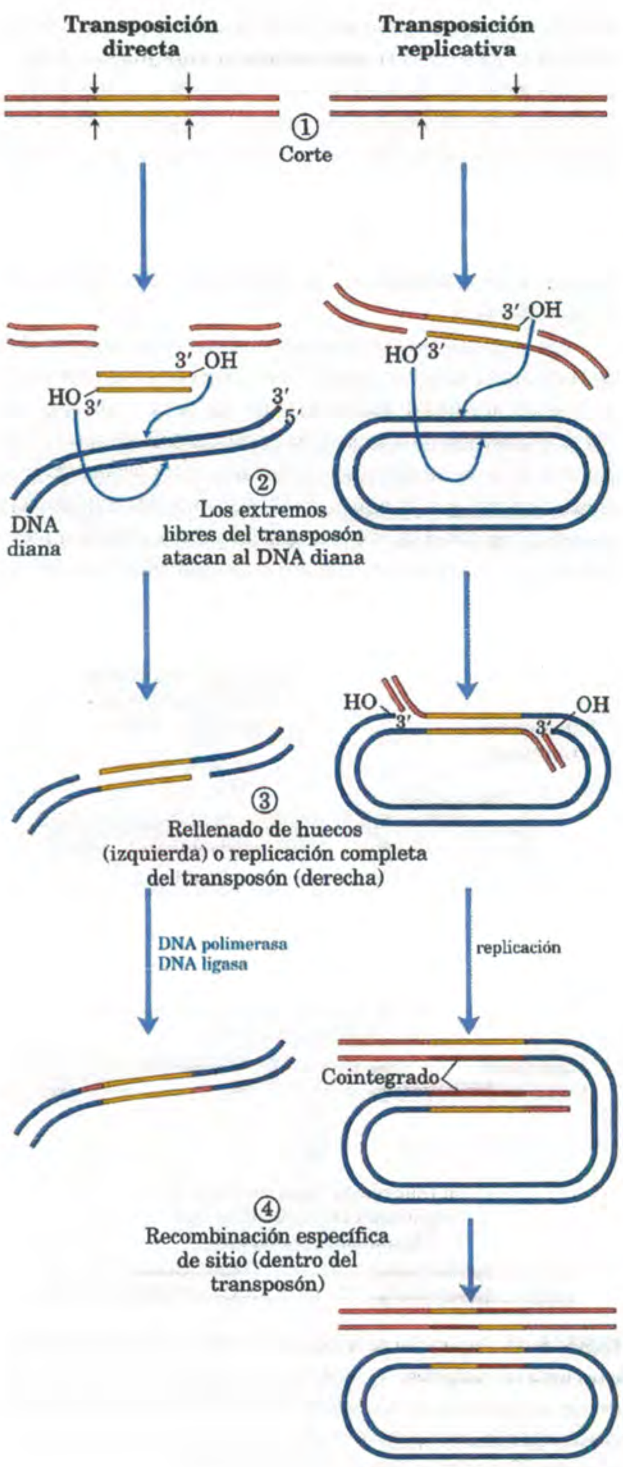


FIGURA 25–44 Duplicación de la secuencia de DNA en un sitio diana cuando se inserta un transposón. Las secuencias duplicadas por efecto de la inserción de un transposón se muestran en rojo. Estas secuencias tienen generalmente sólo unos pocos pares de bases y su tamaño, comparado con el de un transposón típico, se ha exagerado mucho en este dibujo.

En las bacterias hay dos rutas generales para la transposición. En la transposición directa (o simple) (**Fig. 25–45**, izquierda), el transposón es escindido por cortes en ambos extremos para permitir el movimiento hasta una nueva localización. Este proceso deja una rotura de cadena doble en el DNA dador, que debe ser reparada. En el sitio diana se produce un corte indentado (como en la Fig. 25–44), el transposón es insertado en la rotura y la replicación del DNA llena el hueco para duplicar la secuencia del sitio diana. En la transposición replicativa (Fig. 25–45, derecha), se replica el transposón completo, dejando atrás una copia en el sitio que hace de dador. El **cointegrado** es un intermedio de este proceso, consistente en la región dadora unida covalentemente al DNA del sitio receptor. En el cointegrado hay dos copias completas del transposón, ambas con la misma orientación relativa en el DNA. En algunos transposones bien caracterizados, el cointegrado intermedio se transforma por recombinación específica de sitio, en la que recombinasas especializadas promueven la necesaria reacción de deleción.

Los eucariotas también tienen transposones estructuralmente similares a los transposones bacterianos y, a veces, con mecanismos de transposición similares. En otros casos, sin embargo, el mecanismo de trasposición parece utilizar un intermedio de RNA. Estos transposones han coevolucionado con ciertas clases de virus de RNA. Ambos se describirán en el capítulo siguiente.



Los genes de las inmunoglobulinas se ensamblan por recombinación

Algunos reordenamientos del DNA forman parte del programa de desarrollo de los organismos eucaróticos. Un ejemplo importante es la producción de genes completos de inmunoglobulinas a partir de segmentos de genes que se encuentran separados en el genoma de los vertebrados. Los humanos (como otros mamíferos) son capaces de producir *millones* de inmunoglobulinas (anticuerpos) diferentes con especificidades de unión diferentes, a pesar de que el genoma humano sólo contiene unos 29.000 genes. La recombinación permite a un organismo producir una variedad extraordinaria de anticuerpos a partir de una capacidad de codificación limitada. El estudio del mecanismo de recombinación ha mostrado una estrecha relación con la transposición del DNA, y sugiere que el sistema para generar la diversidad de los anticuerpos puede haber evolucionado a partir de una antigua invasión celular de transposones.

Los genes humanos que codifican las inmunoglobulinas de la clase G (IgG) pueden servir para ilustrar cómo se genera la diversidad de los anticuerpos. Las inmunoglobulinas están for-

FIGURA 25–45 Dos rutas generales para la transposición: directa (simple) y replicativa. ① El DNA se corta en primer lugar a cada lado del transposón en los lugares indicados por las flechas. ② Los grupos 3′-hidroxilo liberados en los extremos del transposón actúan de nucleófilos en un ataque directo sobre los enlaces fosfodiéster del DNA diana. Los enlaces fosfodiéster diana están desplazados (no se encuentran uno enfrente del otro) en las dos cadenas del DNA. ③ El transposón se encuentra ahora unido al DNA diana. En la transposición directa (izquierda), la replicación llena los huecos en cada extremo para completar el proceso. En la transposición replicativa (derecha) se replica el transposón entero formándose un intermedio cointegrado. ④ El cointegrado es a menudo escindido más tarde con ayuda de otro sistema de recombinación específico de sitio. El DNA huésped cortado dejado atrás por la transposición directa es reparado por unión de los extremos del DNA o bien degradado (no mostrado). Esta última posibilidad puede ser letal para el organismo.

madas por dos cadenas polipeptídicas pesadas y dos ligeras (véase la Fig. 5–21). Cada cadena tiene dos regiones, una región variable, con una secuencia que difiere mucho de una inmunoglobulina a otra, y otra región que es prácticamente constante dentro de cada clase de inmunoglobulinas. Existen también dos familias distintas de cadenas ligeras, denominadas kappa y lambda, que difieren algo en la secuencia de sus regiones constantes. Para cada uno de los tres tipos de cadena polipeptídica (cadena pesada y cadenas ligeras kappa y lambda), la diversidad en las regiones variables se genera mediante un mecanismo similar. Los genes de estos polipéptidos están divididos en segmentos y el genoma contiene agrupamientos con múltiples versiones de cada segmento. La unión de una versión de cada segmento crea un gen completo.

La **Figura 25–46** representa la organización del DNA que codifica las cadenas ligeras kappa de las IgG humanas, y muestra cómo se genera una cadena ligera kappa. En células indiferenciadas, la información que codifica esta cadena polipeptídica está distribuida en tres segmentos. El segmento V (variable) codifica los 95 primeros residuos aminoácidos de la región variable, el segmento J (de unión) codifica los 12 residuos restantes de la región variable y el segmento C codifica la región constante. El genoma contiene unos 300 segmentos V diferentes, 4 segmentos J diferentes y un segmento C.

Cuando una célula madre de la médula ósea se diferencia para formar un linfocito B maduro, un segmento V y uno J son yuxtapuestos por un sistema de recombinación especializado (Fig. 25–46). Durante esta deleción programada de DNA se elimina el DNA intercalado. Hay unas 300 × 4 = 1.200 combinaciones V–J posibles. Este proceso de recombinación no es tan preciso como la recombinación específica de sitio descrita anteriormente, por lo que se producen cambios adicionales de la secuencia en la unión V–J que aumentan la variación global en un factor de al menos 2,5; por tanto, las células pueden generar unas 2,5 × 1.200 = 3.000 combinaciones V–J diferentes. La unión final de la combinación V–J a la región C se obtiene por una reacción de corte y empalme de RNA después de la transcripción, proceso descrito en el Capítulo 26.

En la **Figura 25–47** se ilustra el mecanismo de recombinación para unir los segmentos V y J. Inmediatamente después de cada segmento V y justo antes de cada segmento J se encuentran secuencias señal de recombinación (RSS), a las que se unen unas proteínas denominadas RAG1 y RAG2 (productos del *gen activador* de la *recombinación*). Las proteínas RAG catalizan la formación de una rotura de doble cadena entre las secuencias señal y los segmentos V (o J) que se han de unir. Los segmentos V y J se unen seguidamente con la ayuda de un segundo complejo de proteínas.

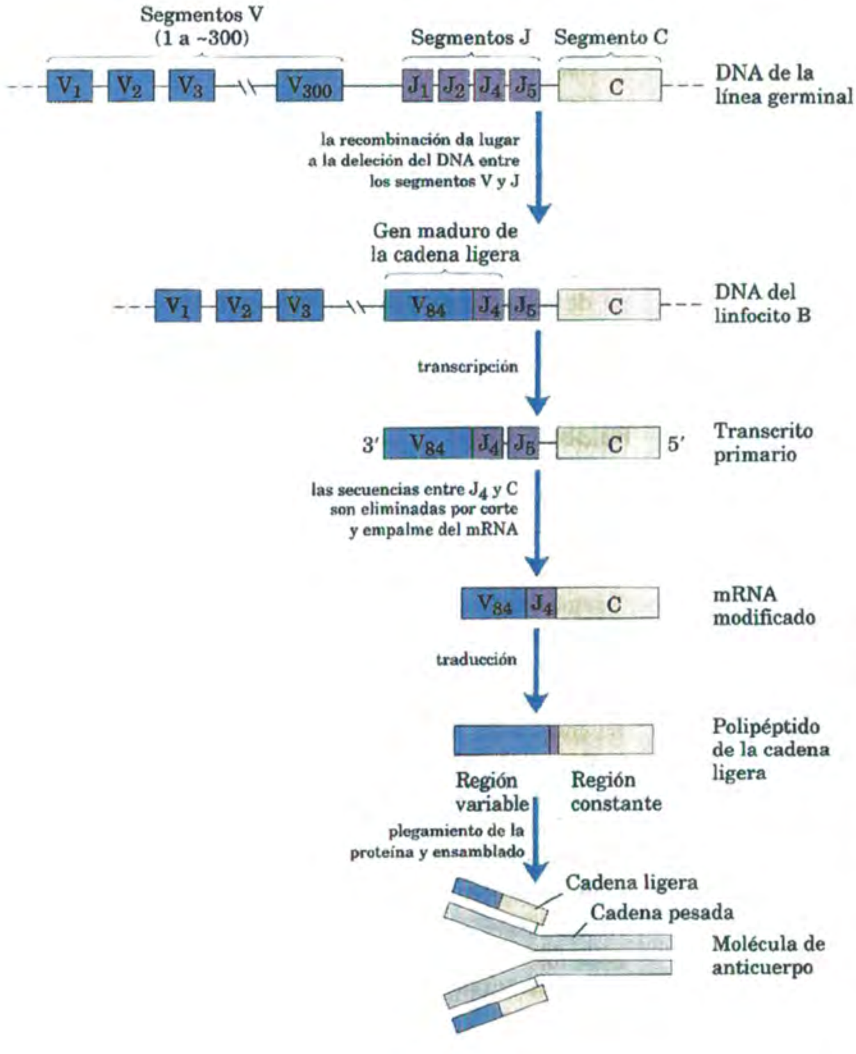


FIGURA 25–46 Recombinación de los segmentos génicos V y J de la cadena ligera kappa de las IgG humanas. El proceso está diseñado para generar la diversidad de los anticuerpos. En la parte superior se muestra la disposición de las secuencias codificantes de las IgG en una célula madre de la médula ósea. La recombinación elimina el DNA entre un segmento V determinado y un segmento J. El transcrito es procesado por corte y empalme del RNA, tal como se describe en el Capítulo 26, y luego traducido para producir el polipéptido de la cadena ligera. La cadena ligera puede combinarse con cualquiera de las 5.000 posibles cadenas pesadas para producir una molécula de anticuerpo.

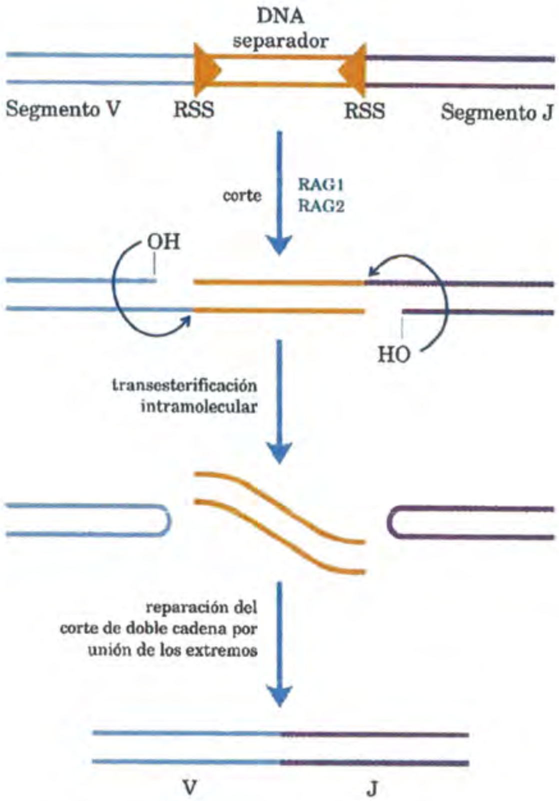


FIGURA 25–47 Mecanismo del reordenamiento génico de las inmunoglobulinas. Las proteínas RAG1 y RAG2 se unen a las secuencias señal de recombinación (RSS) y cortan una cadena del DNA entre la RSS y los segmentos V (o J) que deben unirse. El extremo 3'-hidroxilo liberado actúa entonces de nucleófilo, atacando un enlace fosfodiéster en la otra cadena para crear un corte de doble cadena. Las horquillas resultantes en los extremos de los segmentos V y J son cortadas y los extremos unidos covalentemente por un complejo proteico especializado en la reparación y en la unión de extremos de cortes de doble cadena. Las etapas implicadas en el corte de cadena doble por RAG1 y RAG2 están relacionadas químicamente con las etapas descritas en las reacciones de transposición.

Los genes de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras lambda se forman de modo similar. Para las cadenas pesadas existen más segmentos génicos que para las ligeras, siendo posibles más de 5.000 combinaciones. Debido a que cada cadena pesada se puede combinar con cualquier cadena ligera para generar una inmunoglobulina, cada individuo tiene al menos 3.000×5.000, es decir $1,5 \times 10^7$ IgG posibles. Se genera aún más diversidad debido a que las secuencias V están sujetas a elevadas tasas de mutación (cuyo mecanismo es desconocido) durante la diferenciación de los linfocitos B. Cada linfocito B maduro produce un solo tipo de anticuerpo, pero la gama de anticuerpos producida por los linfocitos B de un organismo individual es claramente enorme.

¿Evolucionó el sistema inmunitario en parte a partir de antiguos transposones? El mecanismo para la producción de cortes de doble cadena por RAG1 y RAG2 es paralelo a varios pasos de la transposición (Fig. 25–47). Además, el DNA eliminado, con sus secuencias terminales RSS, tiene una estructura secuencial que se encuentra en la mayoría de transposones. En el tubo de ensayo, RAG1 y RAG2 peden asociarse con este DNA delecionado e insertarlo, como si fuese un transposón, en otras moléculas de DNA (una reacción que probablemente ocurre sólo muy raramente en los linfocitos B). Aunque no podemos estar seguros, las propiedades del sistema de reordenamiento génico de las inmunoglobulinas sugieren un origen en el cual la distinción entre huésped y parásito ha ido desvaneciéndose a lo largo de la evolución.

RESUMEN 25.3 Recombinación del DNA

- Las secuencias de DNA se reorganizan en las reacciones de recombinación en procesos normalmente muy coordinados con la replicación o la reparación del DNA.
- La recombinación genética homóloga puede producirse entre dos moléculas cualesquiera de DNA que compartan homología de secuencia. En la meiosis (en los eucariotas), este tipo de recombinación contribuye a asegurar la correcta segregación de los cromosomas y a crear diversidad genética. Tanto en las bacterias como en los eucariotas actúa en la reparación de horquillas de replicación bloqueadas. Durante la recombinación homóloga se forma un intermedio de Holliday.
- La recombinación específica de sitio se produce solamente en secuencias diana específicas y este proceso también puede involucrar un intermedio de Holliday. Las recombinasas cortan el DNA en sitios específicos y ligan las hebras con nuevas secuencias. Este tipo de recombinación se encuentra virtualmente en todas las células y entre sus muchas funciones se encuentran la integración del DNA y la regulación de la expresión génica.
- Prácticamente en todas las células, los transposones utilizan la recombinación para moverse dentro o entre cromosomas. En los vertebrados, una reacción de recombinación programada relacionada con la transposición une segmentos génicos de inmunoglobulinas para formar los genes de las inmunoglobulinas durante la diferenciación de los linfocitos B.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

molde 977
replicación semiconservadora 977
horquilla de replicación 978
origen 978
fragmentos de Okazaki 979
hebra conductora 979
hebra rezagada 979
nucleasas 979
exonucleasa 979
endonucleasa 979
DNA polimerasa I 979
cebador 980
extremo terminal del cebador 980
procesividad 980
corrección de pruebas 981
DNA polimerasa *III* 982
replisoma 984
helicasas 984
topoisomerasas 984
primasas 984
DNA ligasas 984
elemento de desenrollamiento del DNA (DUE) 985
AAA+ ATPasas 985
primosoma 987
catenado 991
complejo prerreplicativo (preRC) 991

Bibliografía

General

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., & Ellenberger, T. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd edn, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Un tratamiento detallado del metabolismo del DNA y un buen punto de partida.

Kornberg, A. & Baker, T.A. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Excelente fuente de información básica sobre todos los aspectos del metabolismo del DNA.

Replicación del DNA

Benkovic, S.J., Valentine, A.M., & Salinas, F. (2001) Replisome-mediated DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 181–208.

Esta revisión describe las similitudes en las estrategias y los enzimas de la replicación del DNA en las diferentes clases de organismos.

Bloom, L.B. (2006) Dynamics of loading the *Escherichia coli* DNA polymerase processivity clamp. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 179–208.

Frick, D.N. & Richardson, C.C. (2001) DNA primases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 39–80.

Heller, R.C. & Marians, K.J. (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 932–943.

Mecanismos de reanudación de las horquillas de replicación antes de la reparación del daño en el DNA.

Hübscher, U., Maga, G., & Spadari, S. (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 133–163.

Buen resumen de las propiedades y las funciones de más de una docena de DNA polimerasas eucarióticas bien conocidas.

Indiani, C. & O'Donnell, M. (2006) The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 751–761.

Kamada, K., Horiuchi, T., Ohsumi, K., Shimamoto, N., & Morikawa, K. (1996) Structure of a replication-terminator protein complexed with DNA. *Nature* **383**, 598–603.

Determinación de la estructura del complejo Tus–Ter.

Kool, E.T. (2002) Active site tightness and substrate fit in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 191–219.

Excelente resumen de las bases moleculares de la fidelidad de la replicación por una DNA polimerasa; geometría del apareamiento de bases así como enlaces de hidrógeno.

O'Donnell, M. (2006) Replisome architecture and dynamics in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**, 10,653–10,656.

Excelente resumen del funcionamiento de una horquilla de replicación.

Stillman, B. (2005) Origin recognition and the chromosome cycle. *FEBS Lett.* **579**, 877–884.

Buen resumen del inicio de la replicación en los eucariotas.

Reparación del DNA

Begley, T.J. & Samson, L.D. (2003) AlkB mystery solved: oxidative demethylation of N1-methyladenine and N3-methylcytosine adducts by a direct reversal mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 2–5.

Erzberger, J.P. & Berger, J.M. (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 93–114.

Friedberg, E.C., Fischhaber, P.L., & Kisker, C. (2001) Error-prone DNA polymerases: novel structures and the benefits of infidelity. *Cell* **107**, 9–12.

Goodman, M.F. (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 17–50.

Revisión de una clase de DNA polimerasas en continuo crecimiento.

Kunkel, T.A. & Erie, D.A. (2005) DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 681–710.

Lindahl, T. & Wood, R.D. (1999) Quality control by DNA repair. *Science* **286**, 1897–1905.

Marnett, L.J. & Plastaras, J.P. (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* **17**, 214–221.

Sancar, A. (1996) DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 43–81.

Sutton, M.D., Smith, B.T., Godoy, V.G., & Walker, G.C. (2000) The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 479–497.

Wilson, D.M. III & Bohr, V.A. (2007) The mechanics of base excision repair, and its relation to aging and disease. *DNA Repair* **6**, 544–559.

Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J., & Lindahl, T. (2001) Human DNA repair genes. *Science* **291**, 1284–1289.

Descripción de los resultados de un primer examen del genoma humano acerca de la reparación del DNA.

Recombinación del DNA

Cox, M.M. (2001) Historical overview: searching for replication help in all of the rec places. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8173–8180.

Revisión de cómo se demostró que la recombinación era equivalente a un proceso de reparación de la horquilla de replicación.

Cox, M.M. (2007) Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**, 41–63.

Craig, N.L. (1995) Unity in transposition reactions. *Science* **270**, 253–254.

Gellert, M. (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 101–132.

Grindley, N.D.F., Whiteson, K.L., & Rice, P.A. (2006) Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 567–605.

Hallet, B. & Sherratt, D.J. (1997) Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 157–178.

Haniford, D.B. (2006) Transpososome dynamics and regulation in Tn10 transposition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 407–424.

Examen detallado de un transposón bacteriano bien estudiado.

Lusetti, S.L. & Cox, M.M. (2002) The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 71–100.

Pâques, F. & Haber, J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 349–404.

Singleton, M.R., Dillingham, M.S., Gaudier, M., Kowalczykowski, S.C., & Wigley, D.B. (2004) Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature* **432**, 187–193.

Van Duyne, G.D. (2001) A structural view of Cre-loxP site-specific recombination. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 87–104.

Un buen análisis estructural de un sistema de recombinación específica de sitio.

Problemas

1. Conclusiones del experimento de Meselson–Stahl El experimento de Meselson–Stahl (véase la Fig. 25–2) demostró que la replicación del DNA es semiconservadora en *E. coli*. En el modelo "dispersivo" de la replicación del DNA, las hebras parentales de DNA son cortadas a trozos de tamaño aleatorio, uniéndose seguidamente con piezas del DNA recién replicado para dar nuevos dúplex. Explique cómo los resultados del experimento de Meselson-Stahl descartaron este modelo.

2. Análisis de la replicación del DNA con isótopos pesados Un cultivo de *E. coli* que crece en un medio con $^{15}NH_4Cl$ es transferido a un medio que contiene $^{14}NH_4Cl$ durante tres generaciones (un aumento de ocho veces en la población). ¿Cuál es la relación molar entre el DNA híbrido (^{15}N–^{14}N) y el DNA ligero (^{14}N–^{14}N) en este momento?

3. Replicación del cromosoma de *E. coli* El cromosoma de *E. coli* contiene 4.639.221 pb.

(a) ¿Cuántas vueltas de la doble hélice han de desenrollarse durante la replicación del cromosoma de *E. coli*?

(b) A partir de los datos contenidos en este capítulo, ¿cuánto tiempo tardaría en replicarse el cromosoma de *E. coli* a 37 °C si las dos horquillas de replicación avanzasen desde el mismo origen? Suponga que la replicación avanza a una velocidad de 1000 pb/s. En ciertas condiciones, las células de *E. coli* pueden dividirse cada 20 min. ¿Cómo es posible?

(c) En la replicación del cromosoma de *E. coli*, ¿cuántos fragmentos de Okazaki podrían formarse? ¿Qué factores garantizan que los numerosos fragmentos de Okazaki se unan en el orden correcto en el nuevo DNA?

4. Composición de bases de los DNA obtenidos a partir de moldes de cadena sencilla Determine la composición de bases de la totalidad del DNA sintetizado por la DNA polimerasa a partir de un molde consistente en una mezcla equimolecular de las dos cadenas complementarias del DNA del bacteriófago ϕX174 (una molécula de DNA circular). La composición de bases de una de las cadenas es A, 24,7%; G, 24,1%; C, 18,5% y T, 32,7%. ¿Qué suposición es necesaria para resolver este problema?

5. Replicación del DNA Kornberg y colaboradores incubaron extractos solubles de *E. coli* con una mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, todos ellos marcados con ^{32}P en el grupo α-fosfato. Al cabo de algún tiempo, la mezcla de incubación fue tratada con ácido tricloroacético, que hace precipitar el DNA, pero no los precursores nucleotídicos. El precipitado fue recogido, y la cantidad de precursor incorporado en el DNA fue determinada a partir de la cantidad de radiactividad que estaba presente en el precipitado.

(a) ¿Si cualquiera de los cuatro precursores nucleotídicos fuese omitido de la mezcla de incubación, se encontraría radiactividad en el precipitado? Justifique la respuesta.

(b) ¿Se incorporaría ^{32}P en el DNA si solamente estuviese marcado el dTTP? Justifique la respuesta.

(c) ¿Se encontraría radiactividad en el precipitado si se marcara con ^{32}P el fosfato β o γ en lugar del α de los desoxirribonucleótidos? Explíquelo.

6. La química de la replicación del DNA Todas las DNA polimerasas sintetizan las hebras nuevas del DNA en la dirección 5'→3'. En cierto modo, la replicación de las hebras antiparalelas del DNA sería más sencilla si hubiese un segundo tipo de polimerasa que sintetizase DNA en la dirección 3'→5'. Los dos tipos de polimerasa podrían, en principio, coordinar la síntesis de DNA sin necesidad de los complicados mecanismos requeridos para la síntesis de la hebra rezagada. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado un enzima que sintetice en la dirección 3'→5'. Sugiera dos posibles mecanismos para la síntesis del DNA en dirección 3'→5' El pirofosfato debería ser un producto de ambas reacciones. ¿Podrían uno o ambos mecanismos tener lugar dentro de la célula? ¿Por qué o por qué no? (Pista: Podría suponer el uso de precursores del DNA inexistentes en las células.)

7. Hebras conductora y rezagada Confeccione una tabla que incluya los nombres y compare las funciones de los precursores, los enzimas y otras proteínas necesarios para sintetizar la hebra conductora en comparación con la hebra rezagada durante la replicación del DNA en *E. coli*.

8. Función de la DNA ligasa Algunos mutantes de *E. coli* contienen una DNA ligasa defectuosa. Cuando se suministra timina marcada con ^3H a estos mutantes y se sedimenta el DNA sintetizado en gradientes de sacarosa alcalinos se obtienen dos bandas radiactivas. Una banda es de alta masa molecular, mientras que la otra es de baja masa molecular. Explique este resultado.

9. Fidelidad de la replicación del DNA ¿Qué factores garantizan la fidelidad de la replicación durante la síntesis de la hebra conductora del DNA? ¿Esperaría que la hebra rezagada fuese sintetizada con la misma fidelidad que la hebra conductora? Justifique sus respuestas.

10. Importancia de las DNA topoisomerasas en la replicación del DNA El desenrollamiento del DNA, tal como el que ocurre durante la replicación, afecta la densidad superhelicoidal del DNA. En ausencia de topoisomerasas, el DNA sería sobrenrollado por delante de la horquilla de replicación, a medida que el DNA se fuese desenrollando por detrás. Una horquilla de replicación bacteriana se detiene cuando la densidad superhelicoidal (σ) del DNA por delante de la horquilla de replicación alcanza +0,14, (véase el Capítulo 24).

La replicación bidireccional in vitro de un plásmido que tiene 6.000 pares de bases se inicia en el origen en ausencia de topoisomerasas. El plásmido inicialmente tiene una σ de −0,06. ¿Cuántos pares de bases se desenrollarán y replicarán antes de que las horquillas de replicación se detengan? Suponga que cada horquilla de replicación se desplaza a la misma velocidad y supongo también que están presentes todos los componentes necesarios para la elongación excepto la topoisomerasa.

11. El ensayo de Ames En un medio de cultivo carente de histidina, una fina capa de agar que contiene unas 10^9 células de *Salmonella typhimurium*, auxotrofa para la histidina (células mutantes que requieren histidina para sobrevivir), produce unas 13 colonias durante un período de incubación de 2 días a 37 °C (véase la Fig. 25–21). ¿Cómo pueden aparecer estas colonias en ausencia de histidina? El experimento se repite en presencia de 0,4 μg de 2-aminoantraceno. El número de colonias producido en 2 días excede las 10.000. ¿Qué indica este resultado acerca del 2-aminoantraceno? ¿Qué puede deducir acerca de su carcinogenicidad?

12. Mecanismos de reparación del DNA Las células de plantas y vertebrados metilan frecuentemente la citosina del DNA para formar 5-metilcitosina (véase la Fig. 8–5a). En estas mismas células hay un sistema de reparación especializado que reconoce los apareamientos incorrectos G–T y los repara dando pares de bases G≡C. ¿De qué modo este sistema de reparación puede ser ventajoso para la célula? (Explíquelo en relación con la presencia de 5-metilcitosina en el DNA.)

13. Reparación del DNA en pacientes de xeroderma pigmentosum La dolencia conocida como xeroderma pigmentosum (XP) está causada por mutaciones en al menos siete genes humanos diferentes (Véase el Recuadro 25–1). Las deficiencias se encuentran en su mayoría en genes que codifican enzimas implicados en la ruta de reparación por escisión de nucleótido. Los diferentes tipos de XP se designan por A hasta G (XPA, XPB, etc.), con unas pocas variantes adicionales agrupadas como XP-V.

Cultivos de fibroblastos procedentes de individuos sanos y de pacientes con XPG se irradian con luz ultravioleta, se aisla el DNA, se desnaturaliza y el DNA de cadena sencilla resultante se caracteriza por ultracentrifugación analítica.

(a) Las muestras procedentes de fibroblastos normales muestran una reducción significativa de la masa molecular media del DNA de cadena sencilla después de la irradiación, pero las procedentes de los fibroblastos XPG no muestran esta reducción. ¿Cuál puede ser la causa?

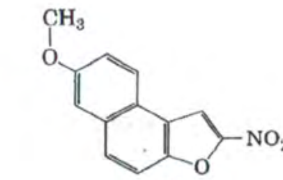
(b) Si suponemos que un sistema de reparación por escisión de nucleótido es operativo en los fibroblastos, ¿qué paso puede ser defectuoso en los fibroblastos de los pacientes con XPG? Justifique la respuesta.

14. Intermedios de Holliday ¿En qué difieren la formación de los intermedios de Holliday en la recombinación genética homóloga y en la recombinación específica de sitio?

15. Conexión entre replicación y recombinación específica de sitio La mayoría de cepas salvajes de *Saccharomyces cerevisiae* contienen múltiples copias del plásmido circular 2μ (llamado así porque su longitud de contorno es de 2 μm), con unos 6.300 pb de DNA. El plásmido usa para su replicación el sistema de replicación del huésped, bajo el mismo estricto control que los cromosomas del huésped, replicándose una sola vez por ciclo celular. La replicación del plásmido es bidireccional, con el inicio de ambas horquillas de replicación en un único origen bien definido. Sin embargo, un ciclo de replicación del plásmido 2μ puede dar más de dos copias del plásmido, lo que resulta en la amplificación del número de copias del plásmido (número de copias del plásmido por célula) siempre que la segregación del plásmido en la división celular genere una célula hija con menos copias de las normales. La amplificación requiere un sistema de recombinación específica de sitio codificado por el plásmido, que sirve para invertir una parte del plásmido en relación a la otra. Explique cómo una inversión específica de sitio podría dar lugar a la amplificación del número de copias del plásmido. (Pista: Considere que las horquillas de replicación han duplicado un sitio de recombinación, pero no el otro.)

Problema de análisis de datos

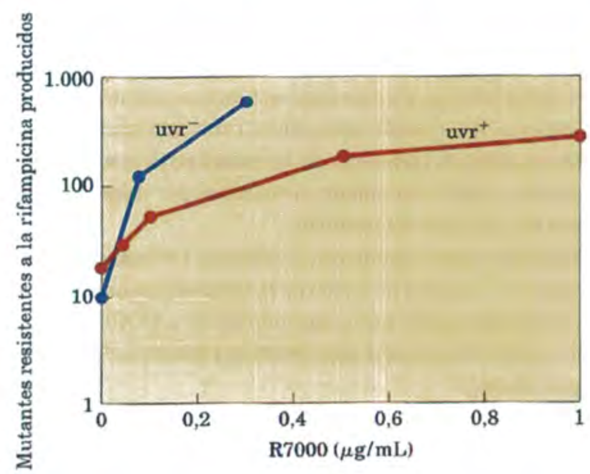
16. Mutagénesis en *Escherichia coli* Muchos compuestos mutagénicos actúan alquilando las bases del DNA. El compuesto alquilante R7000 (7-metoxi-2-nitronaftol[2,1-*b*]furano) (véase fórmula en la columna siguiente) es un mutágeno extremadamente potente. In vivo, el R7000 es activado por el enzima nitrorreductasa y esta forma más reactiva se une covalentemente al DNA, pricipalmente, pero no exclusivamente, a los pares de bases G≡C.



R7000

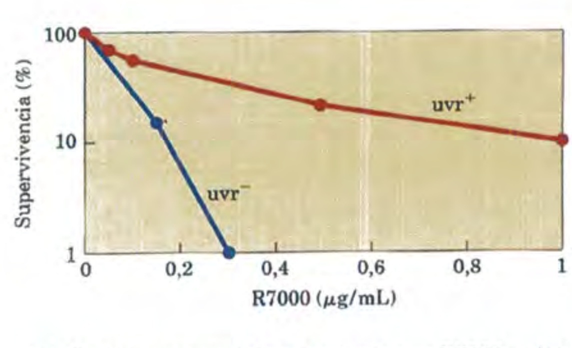
En un trabajo de 1996, Quillardet, Touati y Hofnung exploraron los mecanismos por los que el R7000 provoca mutaciones en *E. coli*. Compararon la actividad genotóxica de R7000 en dos cepas de *E. coli*: el tipo salvaje (uvr$^+$) y mutantes carentes de actividad *uvrA* (uvr$^-$; véase la Tabla 25–6). En primer lugar midieron las tasas de mutagénesis. La rifampicina es un inhibidor de la RNA polimerasa (véase el Capítulo 26). En su presencia, las células no crecen a menos que tengan lugar ciertas mutaciones en el gen que codifica la RNA polimerasa; la aparición de colonias resistentes a la rifampicina es un fiel reflejo de las tasas de mutación.

Se determinaron los efectos de las diferentes concentraciones de R700 con los resultados mostrados en la gráfica siguiente.



(a) ¿Por qué aparecen alnos mutantes incluso en ausencia de R7000?

Quillardet y colaboradores también midieron la tasa de supervivencia de bacterias tratadas con diferentes concentraciones de R7000.



(b) Explique por qué el tratamiento con R7000 es letal para las células.

(c) Explique las diferencias entre las curvas de mutagénesis y las curvas de supervivencia para los dos tipos de bacterias, uvr$^+$ y uvr$^-$, tal como muestran las gráficas.

Los investigadores midieron a continuación la cantidad de R7000 unido covalentemente al DNA en *E. coli* uvr$^+$ y uvr$^-$. In-

cubaron bacterias con [^{3}H]R7000 durante 10 o 70 minutos, extrajeron el DNA y midieron su contenido en ^{3}H en cuentas por minuto (cpm) por μg de DNA.

Tiempo (min)	^{3}H en el DNA (cpm/μg)	
	uvr$^+$	uvr$^-$
10	76	159
70	69	228

(d) Explique por qué la cantidad de ^{3}H disminuye con el tiempo en la cepa uvr$^+$ y aumenta con el tiempo en la cepa uvr$^-$.

A continuación, Quillardet y colaboradores examinaron los cambios concretos de la secuencia del DNA causados por el R7000 en las bacterias uvr$^+$ y uvr$^-$. Para ello, usaron seis cepas diferentes de *E. coli*, cada una con una mutación puntual diferente en el gen *lacZ*, que codifica la β-galactosidasa (este enzima cataliza la misma reacción que la lactasa; véase la Fig. 14–10). Las células con cualquiera de estas mutaciones tienen una β-galactosidasa no funcional y son incapaces de metabolizar lactosa (es decir, tienen un fenotipo Lac$^-$). Cada tipo de mutación puntual requería una mutación inversa específica para restablecer la función génica de *LacZ* y el fenotipo Lac$^+$. La siembra de las células en un medio con lactosa como única fuente de carbono hizo posible seleccionar estas células Lac$^+$ con mutaciones inversas. La frecuencia de cada tipo de mutación se pudo estimar a partir del número de células Lac$^+$ después de la mutación de una cepa determinada.

En primer lugar examinaron el espectro de mutaciones en las células uvr$^-$. La tabla de arriba de la segunda columna muestra los resultados para seis cepas, de CC101 a CC106 (con la mutación puntual necesaria para producir células Lac$^+$ indicada entre paréntesis).

(e) ¿Qué tipos de mutación muestran aumentos significativos por encima de la tasa de referencia debido al tratamiento con R7000? De una explicación plausible del por qué algunos tienen frecuencias más altas que otros.

(f) ¿Pueden explicarse todas las mutaciones indicadas en (e) como una consecuencia de la unión covalente de R7000 a un par de bases G≡C? Explique su razonamiento.

R7000 (μg/mL)	Número de células Lac$^+$ (promedio ± SD)					
	CC101 (A=T a C≡G)	CC102 (G≡C a A=T)	CC103 (G≡C a C≡G)	CC104 (G≡C a T=A)	CC105 (A=T a T=A)	CC106 (A=T a G≡C)
0	6 ± 3	11 ± 9	2 ± 1	5 ± 3	2 ± 1	1 ± 1
0,075	24 ± 19	34 ± 3	8 ± 4	82 ± 23	40 ± 14	4 ± 2
0,15	24 ± 4	26 ± 2	9 ± 5	180 ± 71	130 ± 50	3 ± 2

(g) La Figura 25–28b explica cómo la mutación de los residuos de guanina puede dar lugar a una mutación de G≡C a A=T. Usando una ruta similar, muestre como la unión de R7000 podría dar lugar a las mutaciones de G≡C a A=T o T=A mostradas anteriormente. ¿Qué base se aparea con el grupo R7000?

Los resultados con las bacterias uvr$^+$ se muestran en la tabla siguiente.

R7000 (μg/mL)	Número de células Lac$^+$ (promedio ± SD)					
	CC101 (A=T a C≡G)	CC102 (G≡C a A=T)	CC103 (G≡C a C≡G)	CC104 (G≡C a T=A)	CC105 (A=T a T=A)	CC106 (A=T a G≡C)
0	2 ± 2	10 ± 9	3 ± 3	4 ± 2	6 ± 1	0,5 ± 1
1	7 ± 6	21 ± 9	8 ± 3	23 ± 15	13 ± 1	1 ± 1
5	4 ± 3	15 ± 7	22 ± 2	68 ± 25	67 ± 14	1 ± 1

(h) ¿Indican los resultados obtenidos que todos los tipos de mutaciones son reparados con igual fidelidad? Justifique su respuesta.

Referencia

Quillardet, P., Touati, E., & Hofnung, M. (1996) Influence of the *uvr*-dependent nucleotide excision repair on DNA adducts formation and mutagenic spectrum of a potent genotoxic agent: 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-*b*]furan (R7000). *Mutat. Res.* **358**, 113–122.

> El RNA celular se encuentra en parte en el núcleo, en parte en partículas del citoplasma y en parte como RNA "soluble" en el jugo celular; muchos investigadores han demostrado que el recambio de estas tres fracciones es diferente. Al considerar el papel del RNA en la célula, es muy importante darse cuenta de que éste no es metabólicamente homogéneo y que probablemente haya más de un tipo.
>
> —*Francis H. C. Crick, artículo en* Symposia of the Society for Experimental Biology, *1958*

26

Metabolismo del RNA

La expresión de la información genética requiere generalmente la síntesis de una molécula de RNA, transcrita a partir de un molde de DNA. A primera vista, las cadenas de RNA y de DNA pueden parecer similares, con el grupo hidroxilo en posición 2′ y la sustitución de la timina por uracilo como únicas diferencias. Sin embargo, al contrario del DNA, la mayoría de RNA desempeñan sus funciones en forma de cadena sencilla. Estas cadenas se pliegan sobre sí mismas y poseen el potencial para una diversidad estructural mucho más amplia que la observada en el DNA (Capítulo 8), gracias a la cual el RNA es capaz de asumir una amplia variedad de funciones celulares.

El RNA es la única macromolécula conocida que tiene a la vez funciones en el almacenamiento y la transmisión de la información y en la catálisis, hecho que ha originado muchas discusiones acerca de su posible papel como intermedio químico esencial en el desarrollo de la vida en nuestro planeta. El descubrimiento de los RNA catalíticos, o ribozimas, ha cambiado la propia definición de enzima, extendiéndola más allá del dominio de las proteínas. De todas formas, las proteínas siguen siendo importantes para el RNA y las funciones del mismo. En las células actuales, todos los ácidos nucleicos, incluido el RNA, forman complejos con proteínas. Algunos de estos complejos constituyen maquinarias moleculares muy elaboradas, en las cuales el RNA puede asumir ciertas funciones estructurales y catalíticas.

Con la excepción de los genomas de RNA de ciertos virus, todas las moléculas de RNA se forman a partir de información almacenada permanentemente en el DNA. Durante la **transcripción,** un sistema enzimático convierte la información genética de un segmento de DNA de doble cadena en una cadena de RNA con una secuencia de bases complementaria de una de las cadenas del DNA. Existen tres clases principales de RNA. Los **RNA mensajeros (mRNA)** codifican la secuencia de aminoácidos de uno o más polipéptidos especificados por un gen o por un conjunto de genes. Los **RNA de transferencia (tRNA)** leen la información codificada en el mRNA y transfieren el aminoácido adecuado a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la síntesis proteica. Las moléculas de **RNA ribosómico (rRNA)** forman parte de los ribosomas, las complejas maquinarias celulares que sintetizan las proteínas. Otros muchos RNA especializados tienen funciones reguladoras o catalíticas o son precursores de las tres clases principales de RNA. Estos RNA con función especializada han dejado de considerarse como especies secundarias del catálogo de RNA celulares. En los vertebrados, los RNA que no pertenecen a una de las categorías clásicas (mRNA, tRNA, rRNA) parecen ser ampliamente mayoritarios.

En la replicación normalmente se copia el cromosoma entero, mientras que la transcripción es más selectiva. En un momento dado, sólo son transcritos genes o grupos de genes determinados y algunas regiones del genoma nunca son transcritas. La célula restringe la expresión de la información genética a la formación de los productos génicos necesarios en cada momento. Secuencias reguladoras específicas indican el principio y el final de los segmentos de DNA que han de ser transcritos y designan qué cadena del DNA se ha de utilizar como molde. El propio transcrito puede interaccionar con otras moléculas de RNA como parte del programa regulador global. La regulación de la transcripción se describe en detalle en el Capítulo 28.

El conjunto de todas las moléculas de RNA producidas en una célula en unas condiciones determinadas se denomina

transcriptoma celular. Dada la proporción relativamente pequeña del genoma humano dedicada a genes que codifican proteínas, podríamos suponer que sólo se trascribe una pequeña parte del genoma humano. No es éste el caso. El análisis de los patrones de transcripción mediante microchips ha mostrado que una gran parte del genoma humano y otros mamíferos se transcribe en RNA. Los productos no son principalmente mRNA, tRNA o rRNA, sino RNA con funciones especializadas de los que se han descubierto muchos. Una gran mayoría parecen estar implicados en la regulación de la expresión génica; sin embargo, es forzoso admitir que desconocemos cuál es la función de muchos de estos RNA.

En este capítulo examinamos la síntesis de RNA sobre un molde de DNA y la maduración postsintética y el recambio de las moléculas de RNA. También describiremos muchas de las funciones especializadas del RNA, incluidas las funciones catalíticas. Es de destacar que los sustratos de los enzimas de RNA son a menudo otras moléculas de RNA. También describiremos los sistemas en los que el RNA es el molde y el DNA el producto, y no al revés. Las rutas de la información cierran así el círculo, mostrando que la síntesis de ácidos nucleicos dependiente de un molde obedece a reglas generales, independientemente de la naturaleza del molde o del producto (RNA o DNA). El examen de la interconversión biológica del DNA y el RNA como portadores de información plantea la discusión del origen de la información biológica.

26.1 Síntesis de RNA dependiente de DNA

Comenzaremos la discusión de la síntesis del RNA con la comparación entre la transcripción y la replicación del DNA (Capítulo 25). La transcripción se parece a la replicación en su mecanismo químico fundamental, la polaridad (dirección de la síntesis) y la utilización de un molde. Al igual que la replicación, la transcripción tiene fases de inicio, elongación y terminación, aunque en la literatura sobre transcripción el inicio se subdivide en fases distintas de unión al DNA e inicio de la síntesis de RNA. La transcripción difiere de la replicación en no requerir un cebador y, generalmente, estar limitada a cortos segmentos de la molécula de DNA. Además, dentro de los segmentos transcritos sólo una de las hebras del DNA sirve de molde para una molécula de RNA determinada.

El RNA es sintetizado por RNA polimerasas

El descubrimiento de la DNA polimerasa y su dependencia de un molde de DNA fue un estímulo para la búsqueda de un enzima que sintetizase RNA complementario de una hebra de DNA. Hacia 1960, cuatro grupos de investigación independientes habían detectado un enzima en extractos celulares capaz de formar un polímero de RNA a partir de ribonucleósidos 5′-trifosfato. Investigaciones posteriores con la RNA polimerasa purificada de *Escherichia coli* contribuyeron a definir las propiedades fundamentales de la transcripción **(Fig. 26–1)**. La **RNA polimerasa dependiente de DNA** requiere, además de un molde de DNA, los cuatro ribonucleósidos 5′-trifosfato (ATP, GTP, UTP y CTP) como precursores de las unidades nucleotídicas del RNA, y también Mg^{2+}. La proteína también une un Zn^{2+}. La química y el mecanismo de la síntesis del RNA tiene mucho en común con la síntesis de DNA por las DNA polimerasas (véase la Fig. 25–5). La RNA polimerasa alarga una cadena de RNA añadiendo ribonucleótidos al extremo 3′-hidroxilo de la cadena de RNA, y sintetiza el RNA en dirección 5′→3′. El grupo 3′-hidroxilo actúa como nucleófilo, atacando al fosfato α del ribonucleósido trifosfato entrante (Fig. 26–1b) y liberando pirofosfato. La reacción global es

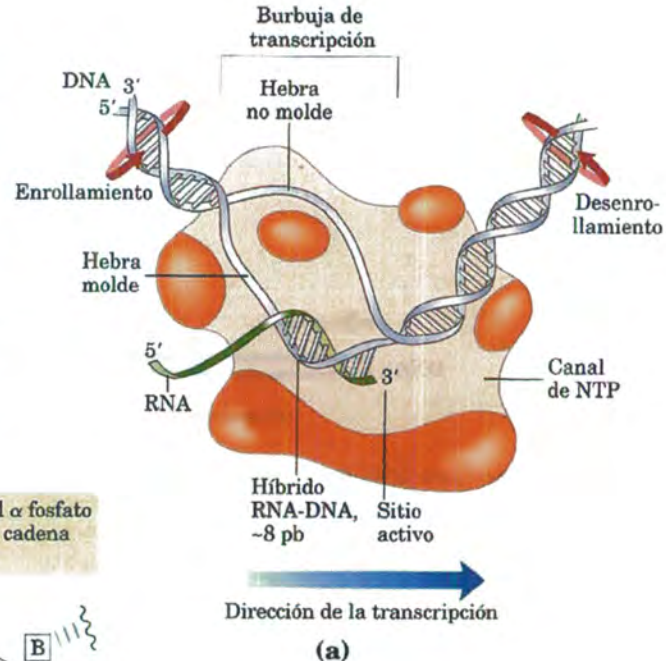
$$\underset{\text{RNA}}{(\text{NMP})_n} + \text{NTP} \longrightarrow \underset{\text{RNA alargado}}{(\text{NMP})_{n+1}} + \text{PP}_i$$

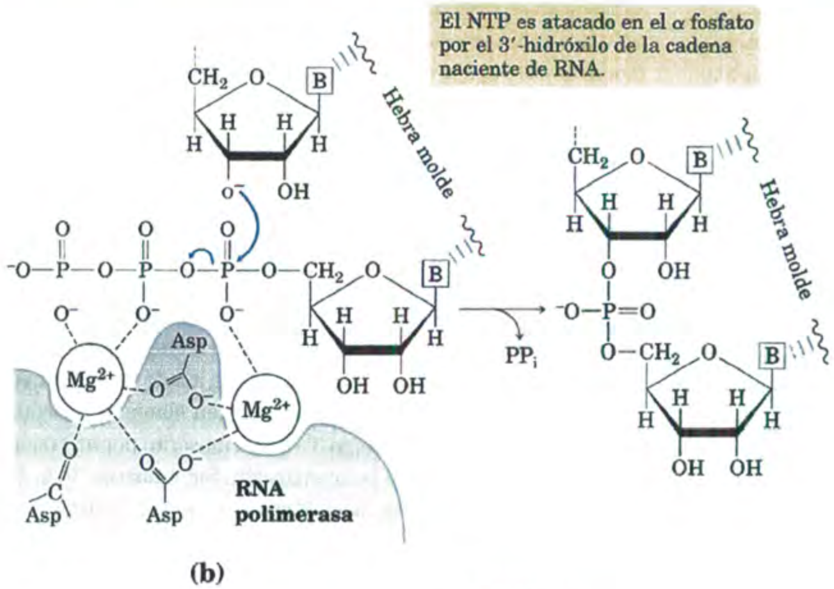
La RNA polimerasa requiere DNA para su actividad, siendo más activa cuando se encuentra unida a un DNA bicatenario. Como se ha indicado anteriormente, sólo se utiliza una de las dos hebras del DNA como molde. La hebra molde se copia en dirección 3′→5′ (antiparalela a la nueva cadena de RNA), tal como en la replicación del DNA. Cada nucleótido en el RNA recién formado se selecciona según las interacciones de apareamiento de bases de Watson y Crick; los residuos de U se insertan en el RNA para aparearse con residuos de A en el DNA molde, los residuos de G se insertan para aparearse con residuos de C, y así sucesivamente. La geometría de los pares de bases (véase la Fig. 25–6) también puede jugar un papel en la selección de las bases.

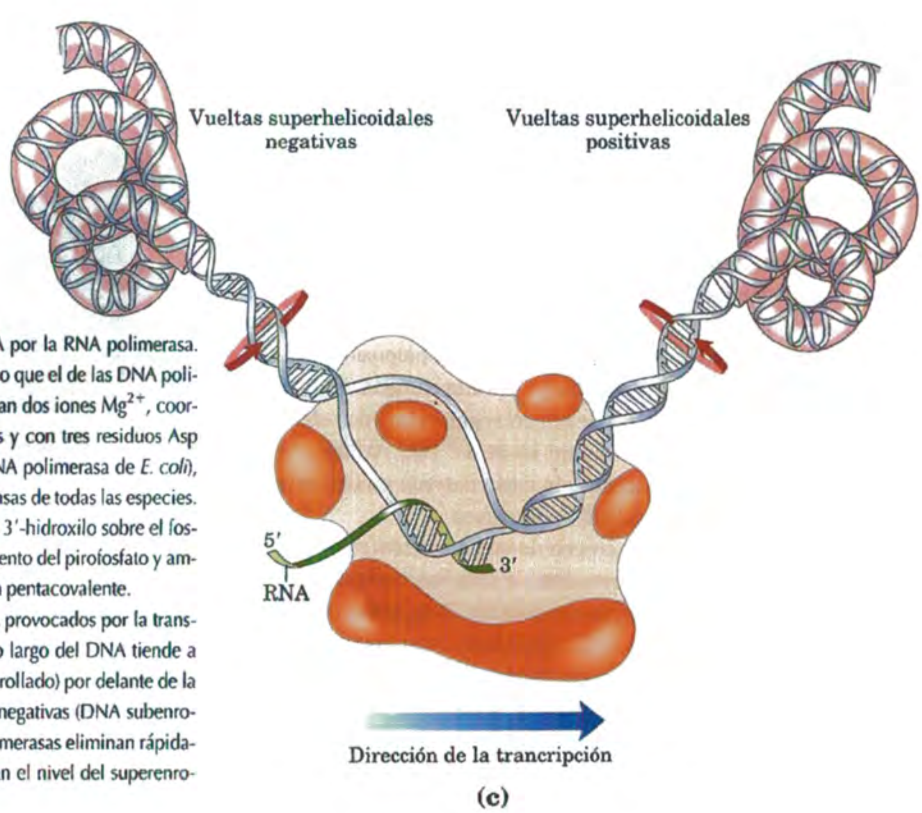
A diferencia de la DNA polimerasa, la RNA polimerasa no requiere un cebador para iniciar la síntesis. El inicio se produce cuando la RNA polimerasa se une a secuencias específicas de DNA denominadas promotores (descritos más adelante). El grupo 5′-trifosfato del primer residuo de una cadena de nueva síntesis no es cortado para liberar PP_i, sino que se mantiene intacto durante toda la transcripción. En la fase de elongación de la trascripción, el extremo en crecimiento de la nueva cadena de RNA se aparea temporalmente con el DNA molde para formar una doble hélice híbrida RNA-DNA de una longitud estimada de 8 pb (Fig. 26–1a). El RNA en este dúplex híbrido se "despega" poco después de su formación y se restablace el dúplex de DNA.

Para permitir que la RNA polimerasa sintetice una cadena de RNA complementaria de una de las hebras del DNA, el dúplex de DNA ha de desenrollarse a lo largo de una corta distancia, formando una "burbuja" de transcripción. Durante la transcripción, la RNA polimerasa de *E. coli* mantiene generalmente unos 17 pb desenrollados. El híbrido de RNA-DNA de 8 pb se encuentra en esta región desenrollada. La elongación de los transcritos por la RNA polimerasa de *E. coli* transcurre a una velocidad de unos 50 a 90 nucleótidos/s. La estructura helicoidal del DNA obliga a una rotación considerable de las hebras de las moléculas de ácido nucleico durante el movimiento de las burbujas de transcripción. La rotación de las hebras del DNA está restringida en la mayor parte del DNA por proteínas de unión a DNA y por otras barreras estructurales. Por ello el movimiento de la RNA polimerasa genera ondas de vueltas superhelicoidales positivas por delante de la burbuja de transcripción y de vueltas superhelicoidales negativas por detrás (Fig. 26–1c). Este fenómeno se ha observado tanto in vitro como in vivo (en bacterias). En la célula, la acción de las topoisomerasas alivia los problemas topológicos ocasionados por la transcripción (Capítulo 24).

FIGURA DE MECANISMO 26–1 Transcripción por la RNA polimerasa en *E. coli*. Para sintetizar una hebra de RNA complementaria de una de las dos hebras del DNA en doble hélice, el DNA se desenrolla temporalmente. **(a)** En todo momento están desenrollados unos 17 pb. La RNA polimerasa y la burbuja de transcripción se desplazan tal como se muestra de izquierda a derecha a lo largo del DNA, lo que facilita la síntesis del RNA. El DNA se desenrolla por delante y se vuelve a enrollar por detrás a medida que se transcribe el RNA. Las flechas rojas indican el sentido de la rotación del DNA para permitir este proceso. A medida que el DNA se vuelve a enrollar, se desplaza el híbrido RNA-DNA y se expulsa la hebra de RNA. La RNA polimerasa está en íntimo contacto con el DNA por delante de la burbuja de transcripción, así como con las cadenas de DNA separadas y con el RNA dentro e inmediatamente por detrás de la burbuja. Un canal en la proteína encauza nuevos nucleósidos trifosfato (NTP) hacia el sitio activo de la polimerasa. La huella de la polimerasa abarca unos 35 pb de DNA durante la elongación.







(b) Mecanismo catalítico de la síntesis de RNA por la RNA polimerasa. Observe que el mecanismo es esencialmente el mismo que el de las DNA polimerasas (véase la Fig. 25–5b). En la reacción participan dos iones Mg^{2+}, coordinados con los grupos fosfato de los NTP entrantes y con tres residuos Asp (Asp^{460}, Asp^{462} y Asp^{464} de la subunidad β' de la RNA polimerasa de *E. coli*), que están altamente conservados en las RNA polimerasas de todas las especies. Uno de los iones Mg^{2+} facilita el ataque por el grupo 3'-hidroxilo sobre el fosfato α del NTP; el otro ión Mg^{2+} facilita el desplazamiento del pirofosfato y ambos iones metálicos estabilizan el estado de transición pentacovalente.

(c) Cambios en el superenrollamiento del DNA provocados por la transcripción. El movimiento de una RNA polimerasa a lo largo del DNA tiende a crear vueltas superhelicoidales positivas (DNA sobrenrollado) por delante de la burbuja de transcripción y vueltas superhelicoidales negativas (DNA subenrollado) por detrás de la misma. En la célula, las topoisomerasas eliminan rápidamente las vueltas superhelicoidales positivas y regulan el nivel del superenrollamiento negativo (Capítulo 24).

FIGURA 26–2 Cadenas molde y no molde (codificante) del DNA. Las dos cadenas complementarias del DNA se definen por su función en la transcripción. El transcrito de RNA se sintetiza sobre la hebra molde complementaria, siendo idéntica en secuencia (con U en lugar de T) a la hebra codificante no molde, o hebra codificante.

(5′) CGCTATAGCGTTT(3′)	Hebra no molde (codificante) de DNA
(3′) GCGATATCGCAAA(5′)	Hebra molde de DNA
(5′) CGCUAUAGCGUUU(3′)	Transcrito de RNA

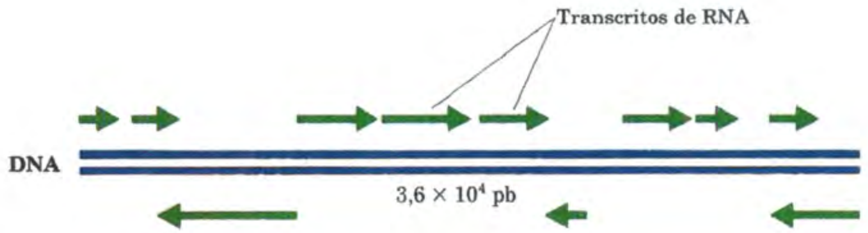


FIGURA 26–3 Organización de la información codificante en el genoma del adenovirus. La información genética del genoma de los adenovirus (un ejemplo sencillo y conveniente) está codificada en una molécula de DNA de doble hebra de 36.000 pb, cuyas dos hebras codifican proteínas. La información para la mayor parte de las proteínas está codificada en la hebra superior (es decir, es idéntica a la misma; por convención, la hebra orientada 5′ a 3′ de izquierda a derecha). La hebra inferior actúa de molde para estos transcritos. No obstante, algunas están codificadas en la hebra inferior, que es transcrita en dirección opuesta (y utiliza la hebra superior como molde). La síntesis de los mRNA en los adenovirus es de hecho mucho más compleja de lo que se muestra aquí. Muchos de los mRNA que se muestran para la hebra superior se sintetizan inicialmente en forma de un transcrito largo (25.000 nucleótidos), que es extensamente modificado para producir los mRNA individuales. Los adenovirus provocan infecciones del tracto respiratorio superior en algunos vertebrados.

CONVENCIÓN CLAVE: Las dos hebras de DNA complementarias tienen papeles diferentes en la transcripción. La hebra que sirve de molde para la síntesis de RNA se denomina **hebra molde.** La hebra de DNA complementaria del molde, la **hebra no molde** o **hebra codificante,** es idéntica en secuencia de bases al RNA transcrito a partir del gen, con T en lugar de U **(Fig. 26–2).** La secuencia codificante de un gen particular puede estar situada en cualquiera de las dos hebras de un determinado cromosoma (como se muestra en la **Fig. 26–3** para un virus). Las secuencias reguladoras que controlan la transcripción (descritas más adelante en este capítulo) se designan convencionalmente por las secuencias de la hebra codificante. ■

La RNA polimerasa dependiente de DNA de *E. coli* es un enzima complejo y de gran tamaño con cinco subunidades núcleo ($\alpha_2\beta\beta'\omega$; M_r 390.000) y una sexta subunidad, perteneciente al grupo denominado σ, con variantes que se designan por su tamaño (masa molecular). La subunidad σ se une transitoriamente al núcleo de la RNA polimerasa y dirige el enzima hacia sitios específicos de unión en el DNA (descritos a continuación). Estas seis subunidades constituyen el holoenzima de la RNA polimerasa **(Fig. 26–4).** Hay pues varias formas del holoenzima de la RNA polimerasa de *E. coli* según el tipo de subunidad σ. La subunidad más común es la σ^{70} (M_r 70.000) y la discusión que sigue a continuación está centrada en el correspondiente holoenzima de la RNA polimerasa.

Las RNA polimerasas carecen de un sitio activo con actividad exonucleasa 3′→5′ correctora de pruebas independiente (tal como el que se encuentra en muchas DNA polimerasas) y por ello la tasa de error en la transcripción es mayor que en la replicación del DNA cromosómico, aproximadamente un error por cada 10^4 o 10^5 ribonucleótidos incorporados en el RNA. Dado que de un solo gen se producen muchas copias de RNA y que todos los RNA son finalmente degradados y reemplazados, un error en una molécula de RNA tiene menos consecuencias para la célula que un error en la información permanente almacenada en el DNA. Muchas RNA polimerasas, incluida la RNA polimerasa bacteriana y la RNA polimerasa II eucariótica (estudiada más adelante) se detienen cuando se añade una base mal apareada durante la transcripción y pueden eliminar nucleótidos mal apareados del extremo 3′ de un transcrito por inversión directa de la reacción de polimerización. Sin embargo, todavía no sabemos si se trata de una auténtica función correctora y en qué medida contribuye a la fidelidad de la transcripción.

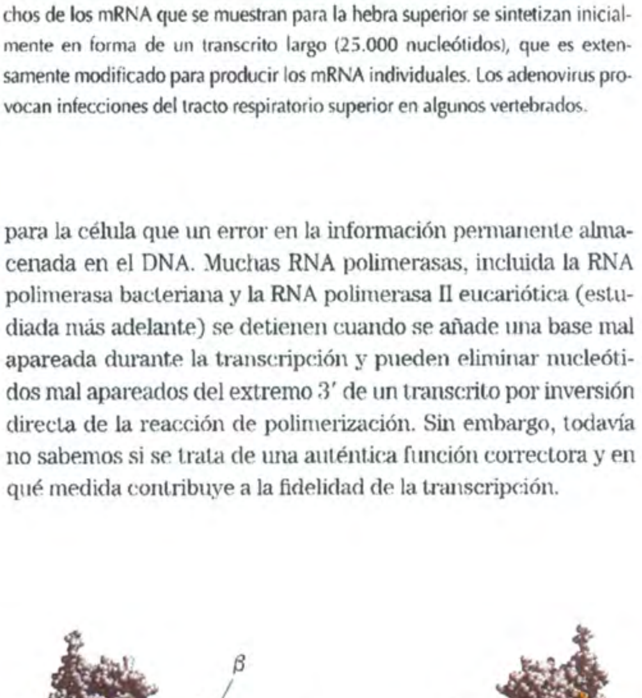


FIGURA 26–4 Estructura del holoenzima de la RNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*. (Obtenido de PDB ID 1IW7). La estructura general de este enzima es muy similar a la de la RNA polimerasa de *E. coli*; el DNA o el RNA no están representados. La subunidad β se muestra en gris, la subunidad β' en blanco, las dos subunidades α en diferentes tonos de rojo, la subunidad ω en amarillo y la subunidad σ en naranja. La imagen de la izquierda está orientada como en la Figura 26–6. Cuando la estructura se gira 180° alrededor de eje *y* (derecha) es visible la pequeña subunidad ω.

La síntesis de RNA empieza en los promotores

El inicio de la síntesis de RNA en puntos al azar de la molécula de DNA sería un proceso sumamente antieconómico. Por el contrario, la RNA polimerasa se une a secuencias específicas del DNA denominadas **promotores,** las cuales dirigen la transcripción de segmentos adyacentes de DNA (genes). Las secuencias de unión de las RNA polimerasas pueden ser muy variadas. La identificación de las secuencias necesarias para la función del promotor ha exigido un gran esfuerzo de investigación.

En *E. coli*, la RNA polimerasa se une a una región que se extiende desde unos 70 pb antes del sitio de inicio de la transcripción hasta unos 30 pb más allá. Por convención, los pares de bases del DNA que corresponden al principio de la molécula de RNA reciben números positivos y los que preceden al sitio de inicio del RNA reciben números negativos. La región del promotor se extiende, pues, de -70 y $+30$. El análisis y la comparación de las secuencias de la clase más común de promotores bacterianos (los reconocidos por la RNA polimerasa holoenzima que contiene σ^{70}) ha puesto de manifiesto similitudes en dos cortas secuencias centradas alrededor de las posiciones -10 y -35 **(Fig. 26–5)**. Estas secuencias son importantes sitios de interacción para la subunidad σ^{70}. Las secuencias no son idénticas en todos los promotores bacterianos, pero los nucleótidos que se encuentran con mucha más frecuencia que otros en cada posición forman una **secuencia consenso** (recuerde la secuencia consenso *oriC* de *E. coli;* véase la Fig. 25–11). La secuencia consenso en el entorno a la región -10 es (5′)TATAAT(3′); la secuencia consenso en la región -35 es (5′)TTGACA(3′). Un tercer elemento de reconocimiento rico en AT, denominado elemento UP (promotor corriente arriba), se encuentra entre las posiciones -40 y -60 en los promotores de algunos genes con un nivel de expresión elevado. La subunidad α de la RNA polimerasa se une al elemento UP. La eficacia de unión y de inicio de la transcripción en un promotor por la RNA polimerasa que contiene σ^{70} depende en buena medida de estas secuencias, del espaciado entre ellas y de su distancia del sitio de inicio de la transcripción.

Numerosas pruebas obtenidas de manera independiente atestiguan la importancia funcional de las secuencias en las regiones -35 y -10. Las mutaciones que alteran la función de un promotor determinado afectan normalmente a uno de los pares de bases en estas regiones.

Los cambios en la secuencia consenso también afectan la eficiencia de la unión de la RNA polimerasa y el inicio de la transcripción. El cambio de una sola base puede disminuir la tasa de unión en varios órdenes de magnitud. La secuencia del promotor determina, pues, el nivel de expresión basal de los diferentes genes de *E. coli*, que puede ser muy variable. Un método para estudiar la interacción de los promotores con la RNA polimerasa se muestra en el Recuadro 26–1.

La ruta de inicio de la transcripción y el destino de la subunidad σ se conocen cada vez mejor **(Fig. 26–6a)**. Consta de dos partes principales, unión e inicio, cada una con múltiples etapas. En primer lugar, la polimerasa, dirigida por su factor σ unido, se une al promotor y forma sucesivamente un complejo cerrado (en el que el DNA unido está intacto) y un complejo abierto (en el que el DNA unido está intacto pero parcialmente desenrollado cerca de la secuencia -10). En segundo lugar, empieza la transcripción, que va acompañada por un cambio de conformación que transforma el complejo en la forma propia de la elongación. El movimiento del complejo de transcripción lo aleja del promotor (desalojo del promotor). Cualquiera de estas etapas puede verse afectada por la secuencia del promotor. La

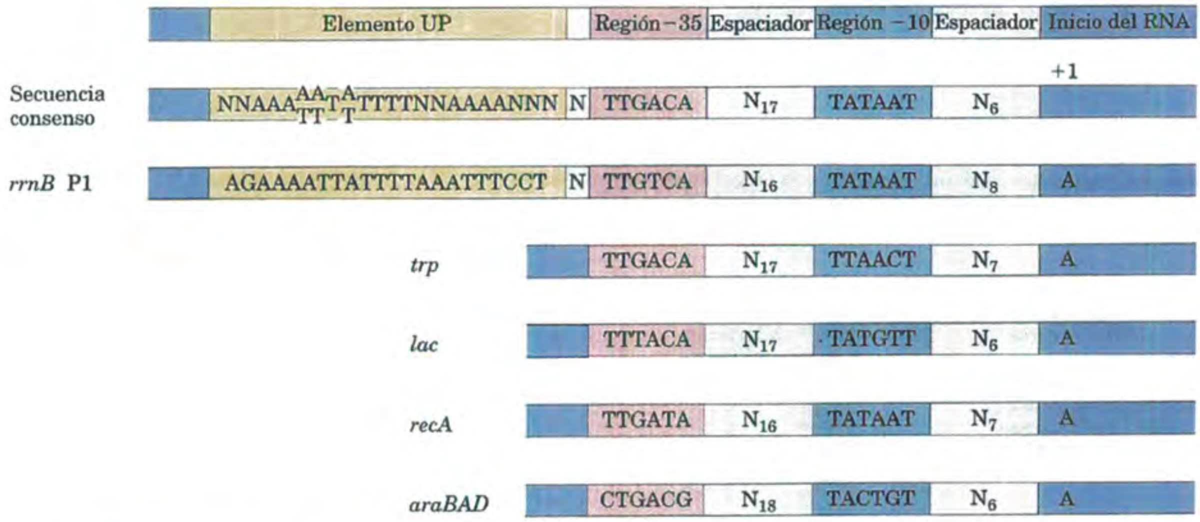


FIGURA 26–5 Típicos promotores de *E. coli* reconocidos por el holoenzima de la RNA polimerasa que contiene σ^{70}. Se muestran las secuencias de la hebra no molde que son leídas en dirección 5′→3′, como se acostumbra en representaciones de este tipo. Las secuencias varían de un promotor a otro, pero la comparación de muchos promotores pone de manifiesto similitudes, particularmente en las regiones -10 y -35. La secuencia del elemento UP, que no está presente en todos los promotores de *E. coli*, se muestra en el promotor P1 del gen de rRNA altamente expresado *rrnB*. Los elementos UP se encuentran por lo general en la región entre -40 y -60 y estimulan fuertemente la transcripción en los promotores que los contienen. El elemento UP en el promotor de P1 *rrnB* abarca la región entre -38 y -59. La secuencia consenso de los promotores reconocidos por σ^{70} es la segunda por arriba. Las regiones espaciadoras contienen un número ligeramente variable de nucleótidos (N). Sólo se muestra el primer nucleótido que codifica el transcrito de RNA (en la posición $+1$).

RECUADRO 26–1 MÉTODOS La RNA polimerasa deja su huella en un promotor

La **técnica de la huella,** basada en los principios de la secuenciación del DNA, se utiliza para identificar las secuencias de DNA a las que se une una proteína determinada. Se aísla un fragmento de DNA que supuestamente contiene secuencias reconocidas por una proteína de unión al DNA y se marca radiactivamente un extremo de una de las cadenas (Fig. 1). A continuación se utilizan reactivos químicos o enzimáticos para introducir roturas al azar en el fragmento de DNA (de promedio, una por molécula). La separación de los productos de corte radiactivos (fragmentos rotos de distintas longitudes) mediante electroforesis de alta resolución produce una "escalera" de bandas radiactivas. En un tubo aparte se repite el procedimiento de corte con el fragmento de DNA original al que se ha unido la proteína. Los dos conjuntos de productos de corte se analizan y comparan por electroforesis. En la "escalera" de bandas radiactivas obtenidas de la muestra que contiene la proteína se observa un agujero o "huella", atribuible al DNA protegido por la proteína unida, que identifica las secuencias reconocidas por la proteína.

Se puede determinar la localización precisa del sitio de unión de la proteína por secuenciación directa (véase la Fig. 8–34) del mismo fragmento de DNA, incluyendo los carriles de secuenciación (no mostrados en esta figura) en el mismo gel que la "huella". En la Figura 2 se muestran los resultados de una "huella" de la fijación de la RNA polimerasa a un fragmento de DNA que contiene un promotor. La polimerasa cubre de 60 a 80 pb; la protección por el enzima unido comprende las regiones −10 y −35.

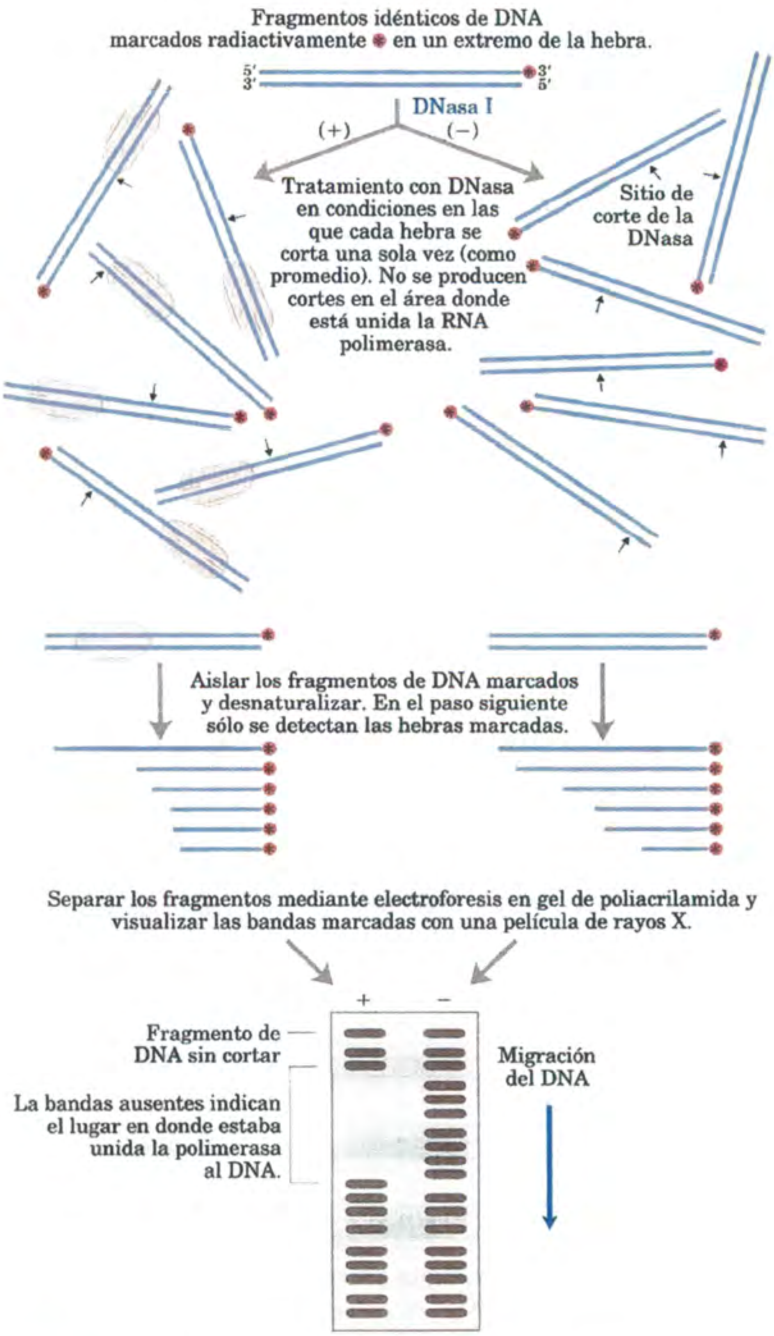


FIGURA 1 Análisis de la huella del sitio de unión de la RNA polimerasa a un fragmento de DNA. Se realizan experimentos separados en presencia (+) y en ausencia (−) de la polimerasa.

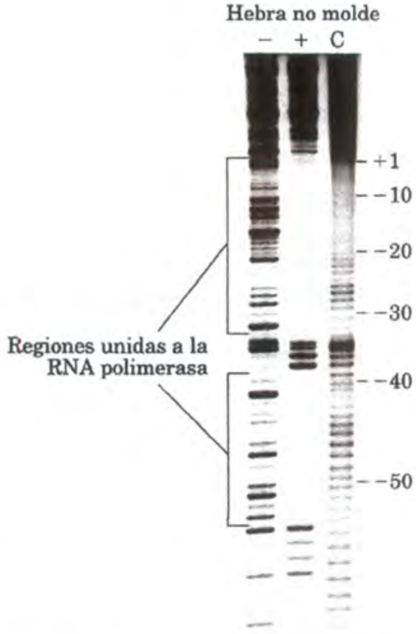
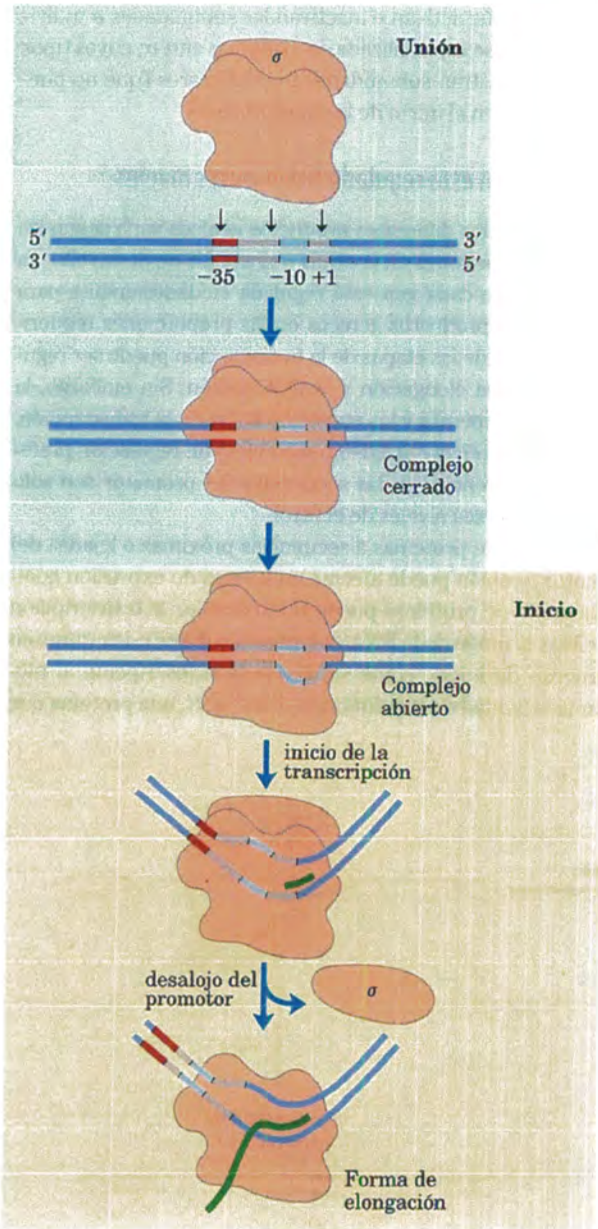


FIGURA 2 Huella de la unión de la RNA polimerasa al promotor *lac* (véase la Fig. 26–5). En este experimento el extremo 5′ de la hebra no molde fue marcado con radiactividad. El carril C es un control en el que los fragmentos de DNA marcado han sido cortados con un reactivo químico que produce un patrón de bandas más uniforme.

subunidad σ se disocia estocásticamente (al azar) cuando la polimerasa entra en la fase de elongación de la transcripción. En la Figura 26–6b se muestra un modelo de la RNA polimerasa en la fase de elongación. La proteína NusA (M_r 54.430) se une a la RNA polimerasa implicada en la elongación en competencia con la subunidad σ. Una vez finalizada la transcripción, NusA se disocia del enzima, la RNA polimerasa se disocia del DNA y un factor σ (σ^{70} u otro) puede unirse a continuación al enzima pa-



(a)

(b)

FIGURA 26–6 Inicio y elongación de la transcripción por la RNA polimerasa de *E. coli*. **(a)** El inicio de la transcripción requiere varias etapas generalmente divididas en dos fases, la unión y el inicio. En la fase de unión, la interacción inicial de la RNA polimerasa con el promotor desemboca en la formación de un complejo cerrado, en el que el DNA promotor está unido de forma estable, pero no está desenrollado. Una región de DNA de 12 a 15 pb (de dentro de la región −10 hasta la posición +2 o +3) es acto seguido desenrollada para formar un complejo abierto. Se han detectado en la ruta intermedios adicionales (no mostrados) que conducen a los complejos abiertos y cerrados, junto con varios cambios de conformación de las proteínas. La fase de inicio comprende el inicio de la transcripción y el desalojo del promotor. Una vez iniciada la elongación, se libera la subunidad σ y la polimerasa abandona el promotor comprometida a elongar el RNA.

(b) La RNA polimerasa núcleo de *E. coli* durante la fase de elongación. La coloración de las subunidades es como en la Figura 26–4: las subunidades β y β' son de color gris claro y blanco; las subunidades α en tonos de rojo. La subunidad ω no es visible en esta vista. La subunidad σ no forma parte de este complejo, al haberse disociado después de las etapas de inicio. El panel superior muestra el complejo completo con DNA y RNA. El sitio activo para la trascripción está en una hendidura entre las subunidades β y β'. En el panel central se ha omitido la subunidad β para exponer el sitio activo y el híbrido DNA-RNA. El sitio activo está señalado en parte por un ión Mg^{2+} (rojo). En el panel inferior se ha eliminado toda la proteína para mostrar la conformación del DNA y el RNA en el complejo.

ra iniciar la transcripción, en un ciclo en ocasiones denominado ciclo σ **(Fig. 26–7)**.

E. coli tiene otras clases de promotores a los que se unen los holoenzimas de la RNA polimerasa por medio de subunidades σ diferentes (Tabla 26–1). Un ejemplo son los promotores de los genes del choque térmico. Los productos de este conjunto de genes son producidos en mayores cantidades cuando la célula ha sido objeto de una agresión, tal como un aumento brusco de la temperatura. La RNA polimerasa sólo se une a los promotores de estos genes cuando σ^{70} es reemplazada por la subunidad σ^{32} (M_r 32.000), que es específica de los promotores del choque térmico (véase la Fig. 28–3). La utilización de diferentes subunidades σ permite a la célula coordinar la expresión de conjuntos de genes implicados en importantes cambios de la fisiología celular. Qué conjuntos de genes son expresados viene determinado por la disponibilidad de las diversas subunidades σ, que a su vez está determinada por diferentes factores: velocidades reguladas de síntesis y degradación, modificaciones postsintéticas que activan o inactivan las subunidades σ individuales y una clase especializada de proteínas anti-σ, cuyos tipos se unen y secuestran subunidades σ particulares (que no pueden ser usadas en el inicio de la transcripción).

La transcripción está regulada a diferentes niveles

La demanda de los diferentes productos génicos varía según las condiciones imperantes en la célula o el estadio de desarrollo. La transcripción de cada gen está regulada cuidadosamente para suministrar los productos génicos en las proporciones requeridas. Cualquiera de las etapas de la transcripción puede ser regulada, incluidas la elongación y la terminación. Sin embargo, la unión de la polimerasa y las etapas de inicio de la transcripción, esquematizadas en la Fig. 26–6a, son objeto de regulación preferente. Las diferencias en las secuencias del promotor son sólo uno de los diversos niveles de control.

La unión de proteínas a secuencias próximas o lejanas del promotor también puede afectar los niveles de expresión génica. La unión de proteínas puede tanto *activar* la transcripción al facilitar la unión de la RNA polimerasa o pasos posteriores en el proceso de inicio, como *reprimir* la transcripción al bloquear la actividad de la polimerasa. En *E. coli*, una proteína que

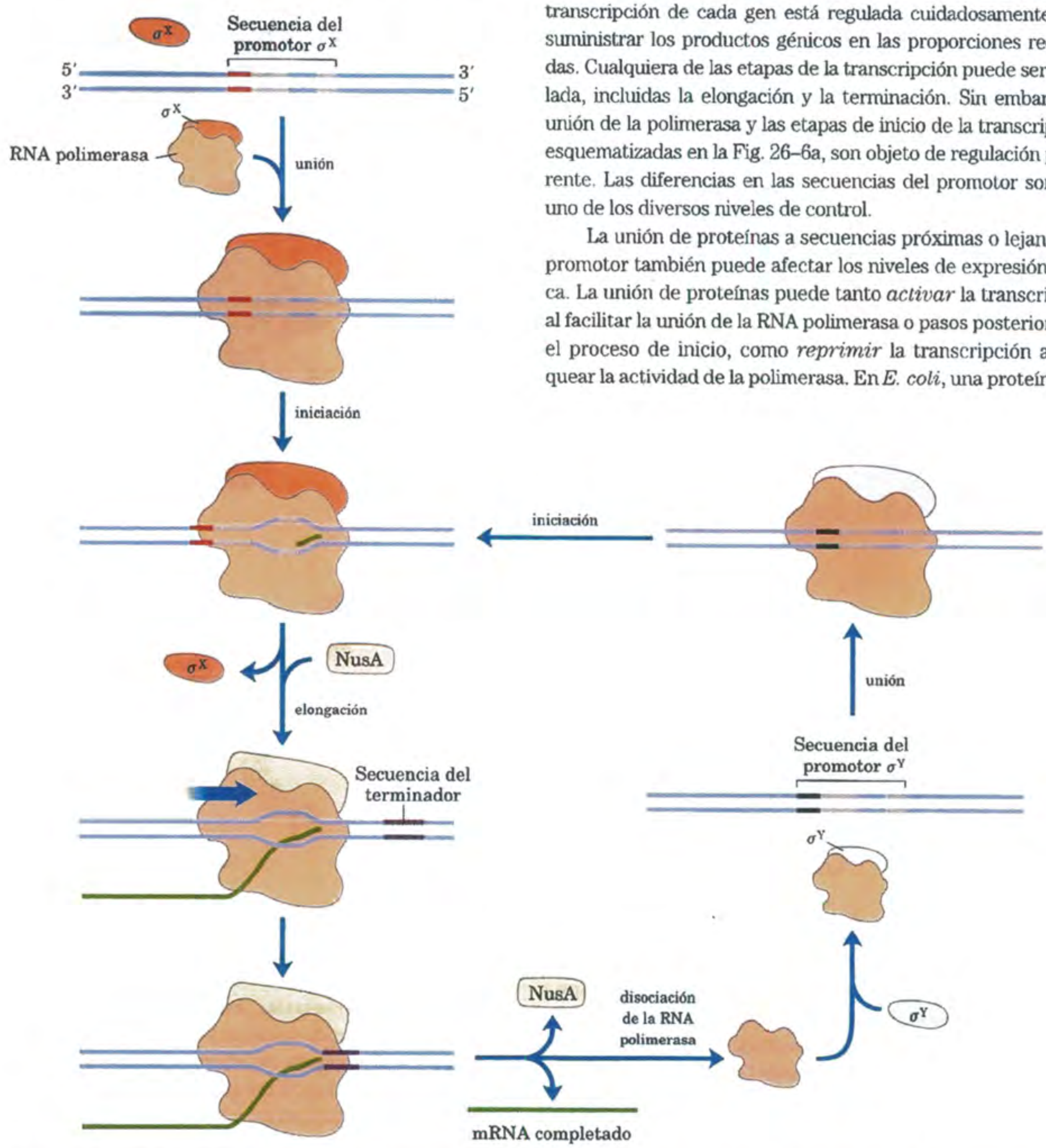


FIGURA 26–7 El ciclo σ. La RNA polimerasa, guiada por una subunidad σ unida, se une al DNA en una secuencia promotora. Una vez iniciada la síntesis del RNA, la subunidad σ se disocia estocásticamente y es reemplazada por NusA. Cuando la RNA polimerasa alcanza una secuencia de terminación, la síntesis de RNA se detiene, NusA se disocia de la polimerasa y la RNA polimerasa se disocia del DNA. La polimerasa libre puede, en principio, unir cualquier subunidad σ. El tipo unido determina el promotor al que se unirá la RNA polimerasa en el siguiente ciclo de síntesis.

TABLA 26–1 Las siete subunidades σ de *Escherichia coli*

Subunidad σ	K_d (nM)	Moléculas/célula*	Relación respecto al holoenzima (%)*	Función
σ^{70}	0,26	700	78	Mantenimiento
σ^{54}	0,30	110	8	Modulación de los niveles celulares de nitrógeno
σ^{38}	4,26	<1	0	Genes de fase estacionaria
σ^{32}	1,24	<10	0	Genes de respuesta al choque térmico
σ^{28}	0,74	370	14	Genes de flagelos y quimiotaxis
σ^{24}	2,43	<10	0	Funciones extracitoplasmáticas; algunas funciones de respuesta al choque térmico
σ^{18}	1,73	<1	0	Funciones extracitoplasmáticas, incluido el transporte de citrato férrico

Fuente: Adaptado de Maeda, H., Fujita, N., & Ishihama, A. (2000) *Nucleic. Acids Res.* **28**, 3500.

Nota: Los factores σ están ampliamente distribuidos en las bacterias; el número varía de uno solo en *Mycoplasma genitalium* a 63 factores σ diferentes en *Streptomyces coelicolor*.

*Número aproximado de cada subunidad σ por célula y fracción del holoenzima de la RNA polimerasa unida a cada subunidad σ durante el crecimiento exponencial. Las cifras cambian en función de las condiciones de crecimiento. La fracción de RNA polimerasa unida con cada subunidad σ refleja tanto la cantidad de una subunidad determinada como su afinidad por el enzima.

activa la transcripción es la **proteína receptora dependiente de cAMP (CRP),** que aumenta la transcripción de genes que codifican los enzimas del metabolismo de los azúcares diferentes de la glucosa cuando las células se cultivan en ausencia de glucosa. Los **represores** son proteínas que bloquean la síntesis de RNA en genes específicos. En el caso del represor Lac (Capítulo 28), la transcripción de los genes correspondientes a los enzimas del metabolismo de la galactosa se bloquea en ausencia de lactosa.

La transcripción es el primer paso de la compleja y energéticamente costosa ruta de la síntesis proteica; por tanto, la regulación de los niveles de proteína se realiza en gran parte a nivel de transcripción, sobre todo en sus primeras etapas. En el Capítulo 28 se describen muchos de estos mecanismos de regulación.

La terminación de la síntesis del RNA está señalizada por secuencias específicas

La síntesis de RNA es procesiva (es decir, la RNA polimerasa tiene una elevada procesividad; véase la p. 980); tiene que ser así necesariamente, porque si una RNA polimerasa libera un transcrito prematuramente no puede reanudar la síntesis del mismo RNA y debe empezar de nuevo. Sin embargo, al topar con ciertas secuencias del DNA se produce una pausa en la síntesis de RNA, y en alguna de estas secuencias termina la síntesis de RNA. El proceso de terminación todavía no se conoce bien en los eucariotas, por lo que nos centraremos de nuevo en las bacterias. *E. coli* posee al menos dos clases de señales de terminación: una clase actúa mediante un factor proteico denominado ρ (rho), mientras que la otra es independiente de ρ.

La clase independiente de ρ tiene dos características distintivas. La primera es una región cuyo transcrito de RNA tiene secuencias autocomplementarias, que permiten la formación de una estructura en horquilla (véase la Fig. 8–19a) centrada 15 a 20 nucleótidos antes del final proyectado de la hebra de RNA. El segundo rasgo es una serie de tres residuos de A en la hebra molde que se transcriben a residuos de U cerca del extremo 3′ de la horquilla. Cuando una polimerasa llega a un sitio de terminación con esta estructura, se detiene **(Fig. 26–8)**. La formación de la estructura en horquilla en el RNA disocia varios pares de bases A═U en el híbrido RNA-DNA y puede desorganizar importantes interacciones entre el RNA y la RNA polimerasa, facilitando de este modo la disociación del transcrito.

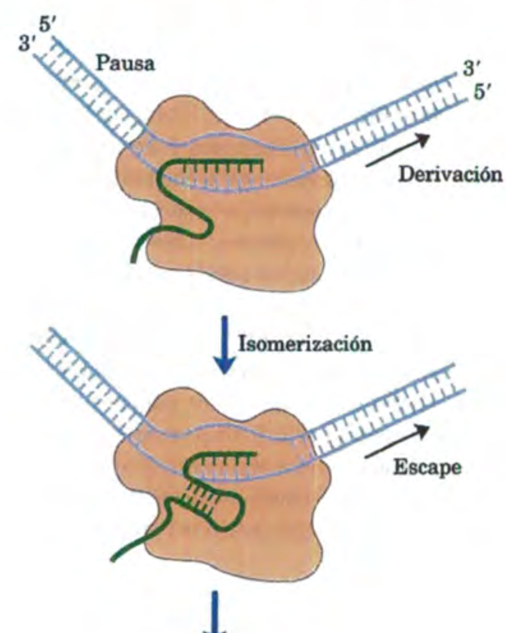


FIGURA 26–8 Modelo de la terminación de la transcripción independiente de ρ en *E. coli*. La RNA polimerasa se detiene en diversas secuencias de DNA, algunas de las cuales son terminadores. Hay entonces dos posibilidades: la polimerasa puede ignorar el sitio y continuar su camino o el complejo puede sufrir un cambio de conformación (isomerización). En el último caso, el apareamiento intramolecular de secuencias complementarias en el transcrito de RNA recién sintetizado puede formar una horquilla que disocia el híbrido RNA-DNA y/o las interacciones entre el RNA y la polimerasa, que tiene como resultado la isomerización. Una región híbrida A═U en el extremo 3′ del nuevo transcrito es relativamente inestable y el RNA se disocia completamente, lo que conduce a la terminación y disociación de la molécula de RNA. Éste es el desenlace habitual en los terminadores. En otros lugares de pausa, el complejo puede escapar después del paso de isomerización para continuar la síntesis de RNA.

Los terminadores dependientes de ρ carecen de la secuencia de residuos de A repetidos en la hebra molde, pero a menudo contienen una secuencia rica en CA denominada elemento *rut* (*u*tilización de *r*ho). La proteína ρ se une al DNA en sitios de unión específicos y migra en dirección 5'→3' hasta encontrar el complejo de transcripción detenido en el sitio de terminación. Una vez allí, contribuye a facilitar la liberación del transcrito de RNA. La proteína ρ posee actividad RNA-DNA helicasa dependiente de ATP, que promueve la translocación de la proteína a lo largo del DNA. El ATP es hidrolizado por la proteína ρ durante el proceso de terminación. Se desconoce el mecanismo detallado por el que la proteína facilita la liberación del transcrito.

Las células eucarióticas tienen tres tipos de RNA polimerasas nucleares

La maquinaria de la transcripción en el núcleo de una célula eucariótica es mucho más compleja que la de las bacterias. Los eucariotas tienen tres RNA polimerasas, designadas como I, II y III, que son complejos distintos, pero con algunas subunidades en común. Cada polimerasa tiene una función específica y se fija a secuencias promotoras específicas.

La RNA polimerasa I (Pol I) es responsable de la síntesis de un solo tipo de RNA, un transcrito denominado RNA prerribosómico (o pre-rRNA), que contiene el precursor de los rRNA 18S, 5,8S y 28S (véase la Fig. 26–25). La secuencia de los promotorores de Pol I varía mucho de una especie a otra. La función principal de la RNA polimerasa II (Pol II) es la síntesis de mRNA y de algunos RNA especializados. Este enzima ha de reconocer miles de promotores, cuyas secuencias pueden diferir ampliamente. Muchos promotores reconocidos por la Pol II tienen algunas características comunes, entre las que se encuentra la caja TATA (secuencia consenso eucariótica TATAAA) cerca del par de bases −30 y una secuencia Inr (iniciador) cerca del inicio de trascripción del RNA en +1 **(Fig. 26–9)**.

La RNA polimerasa III (Pol III) produce tRNA, el rRNA 5S y algunos otros RNA especializados de pequeño tamaño. Los promotores reconocidos por la RNA polimerasa III están bien caracterizados. Es interesante observar que algunas de las secuencias requeridas para el inicio regulado de la transcripción por la Pol III están localizadas dentro del propio gen, mientras que otras se encuentran en localizaciones más convencionales corriente arriba del sitio de inicio del RNA (Capítulo 28).

La RNA polimerasa II requiere otros muchos factores proteicos para su actividad

La RNA polimerasa II es fundamental en la expresión génica eucariótica y ha sido muy estudiada. Aunque esta polimerasa es mucho más compleja que su equivalente bacteriana, la complejidad enmascara una notabla conservación de estructura, función y mecanismo. La Pol II, aislada de levadura, es un gran enzima con 12 subunidades. La subunidad mayor (RBP1) muestra un alto grado de homología con la subunidad β' de la RNA polimerasa bacteriana. Otra subunidad (RBP2) es estructuralmente similar a la subunidad β bacteriana y otras dos (RBP3 y RBP11) muestran alguna homología estructural con las dos subunidades α bacterianas. La Pol II tiene que actuar con genomas más complejos y con moléculas de DNA más cuidadosamente empaquetadas que en las bacterias. Los contactos proteína-proteína con los muchos otros factores proteicos requeridos para navegar en este laberinto explican buena parte de la complejidad añadida de la polimerasa eucariótica.

La subunidad mayor de la Pol II también tiene una propiedad poco usual, una cola carboxilo-terminal, consistente en una secuencia consenso de siete aminoácidos –YSPTSPS– repetida múltiples veces. Hay 27 repeticiones en el enzima de levadura (18 idénticos al consenso) y 52 (21 exactos) en los enzimas de ratón y humanos. Este dominio carboxilo-terminal (CTD) está separado del cuerpo principal del enzima por una secuencia de unión no estructurada. El CTD tiene muchas e importantes funciones en la Pol II, tal como se describe a continuación.

La RNA polimerasa II requiere otras numerosas proteínas, denominadas **factores de trascripción,** necesarios para formar el complejo de transcripción activo. Los **factores de transcripción generales,** requeridos en todos los promotores de la Pol II (factores habitualmente designados TFII con un identificador adicional), están muy conservados en todos los eucariotas (Tabla 26–2). El proceso de transcripción por la Pol II comprende varias fases —ensamblaje, inicio, elongación, terminación— cada una asociada a proteínas específicas **(Fig. 26–10)**. La vía de ensamblaje descrita paso a paso a continuación permite la transcripción in vitro. En la célula, puede

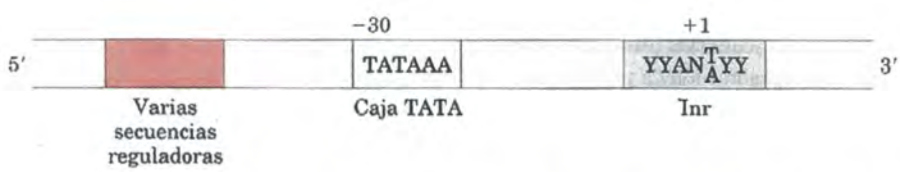


FIGURA 26–9 Secuencias comunes en los promotores reconocidos por la RNA polimerasa II eucariótica. La caja TATA es el principal punto de ensamblaje para las proteínas de los complejos de preinico de Pol II. El DNA se desenrolla en la secuencia de inicio (Inr) y el sitio de inicio de la transcripción se encuentra normalmente en esta secuencia o muy cerca de ella. En la secuencia Inr consenso mostrada, N representa cualquier nucleótido; Y, un nucleótido de pirimidina. Muchas secuencias adicionales sirven de sitios de unión de una amplia gama de proteínas que afectan a la actividad de Pol II. Estas secuencias son importantes en la regulación de los promotores de la Pol II y varían ampliamente en tipo y número, pero en general redundan en una complejidad de los promotores mucho mayor que la mostrada (véase la Fig. 15–23). Muchas de las secuencias están localizadas a unos pocos centenares de pares de bases de la caja TATA en el lado 5'; otras pueden encontrarse alejadas miles de pares de bases. Los elementos de secuencia aquí mostrados varían más entre los promotores de la Pol II de los eucariotas que entre los promotores de *E. coli* (véase la Fig. 26–5). Muchos promotores de Pol II carecen de caja TATA, de un elemento consenso Inr o de ambos. Alrededor de la caja TATA y corriente abajo (a la derecha según esta representación) de Inr puede haber secuencias reconocidas por uno o más factores de transcripción.

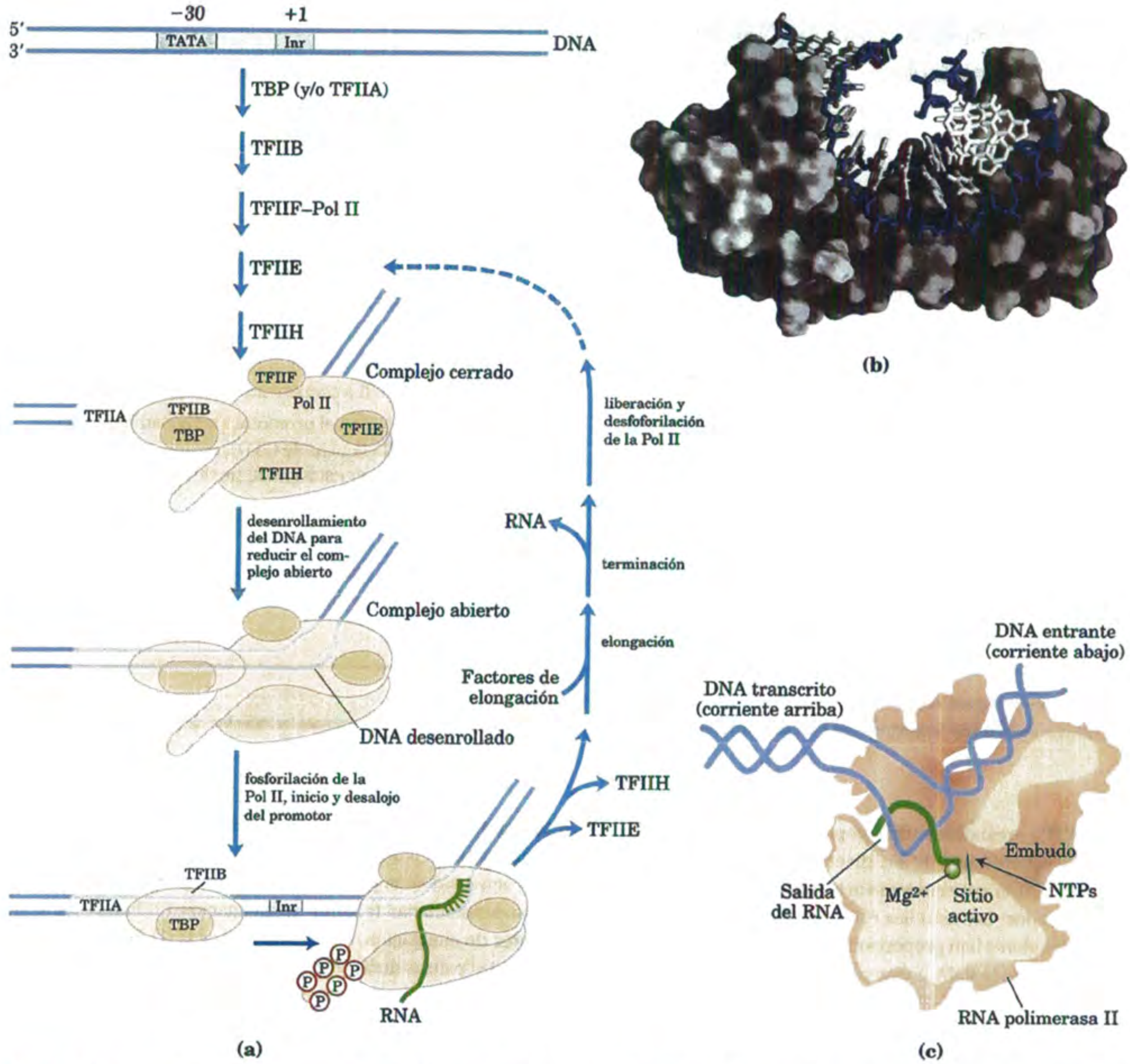


FIGURA 26–10 Transcripción en los promotores de RNA polimerasa II. (a) El ensamblaje secuencial de TBP (a menudo con TIIA), TFIIB, TFIIF más Pol II, TFIIE, y TFIIH da lugar a un complejo cerrado. Dentro del complejo el DNA es desenrollado en la región Inr por la actividad helicasa de TFIIH y tal vez de TFIIE, que crean el complejo abierto. El dominio carboxilo-terminal de la subunidad mayor de la Pol II es fosforilado por TFIIH y entonces la polimerasa abandona el promotor y empieza la transcripción. La elongación está acompañada de la liberación de muchos factores de transcripción y también es potenciada por factores de elongación (véase la Tabla 26–2). Después de la terminación, la Pol II es liberada, desfosforilada y reciclada. **(b)** La TBP humana (gris) unida al DNA (azul y blanco) (PDB ID 1TGH). **(c)** Vista de un corte de la elongación de la transcripción promovida por el enzima núcleo Pol II. El dibujo está basado en la estructura mostrada en la cubierta de este libro.

que muchas proteínas estén presentes como grandes complejos preensamblados, lo cual simplificaría las rutas de ensamblaje sobre los promotores. La Figura 26–10 y la Tabla 26–2 pueden ser útiles para seguir el destino de los muchos elementos de este proceso.

Ensamblaje de la RNA polimerasa y los factores de transcripción en un promotor La formación de un complejo cerrado comienza cuando la proteína de unión a TATA (TBP) se une a la caja TATA (Fig. 26–10b). El factor de transcripción TFIIB se une a su vez a la TBP y también al DNA a ambos lados de la TBP. La unión de TFIIA, aunque no siempre es esencial, puede estabilizar el complejo TFIIB-TBP con el DNA y puede ser importante en los promotores que no son de consenso, en los que la unión de la TBP es relativamente débil. El complejo formado por TFIIF y Pol II se une a continuación al complejo de TFIIB-TBP. TFIIF contribuye a dirigir a la Pol II hacia sus promotores, al interaccionar con TFIIB y reducir la unión de la Pol II a sitios no específicos del DNA. Finalmente, se unen TFIIE y TFIIH para completar el complejo cerrado. TFIIH tiene actividad DNA helicasa, que promueve el desenrollamiento del DNA en el sitio de inicio del RNA (proceso que requiere la hi-

TABLA 26–2 Proteínas necesarias para el inicio de la transcripción en los promotores de la RNA polimerasa II (Pol II) de los eucariotas

Proteínas de transcripción	Número de subunidades	Subunidad(es) M_r	Función(es)
Iniciación			
Pol II	12	10.000–220.000	Cataliza la síntesis de RNA
TBP (proteína de unión a TATA)	1	38.000	Reconoce específicamente la caja TATA
TFIIA	3	12.000, 19.000, 35.000	Estabiliza la unión de TFIIB y TBP al promotor
TFIIB	1	35.000	Se une a TBP; recluta el complejo Pol II–TFIIF
TFIIE	2	34.000, 57.000	Recluta TFIIH; posee actividades ATPasa y helicasa
TFIIF	2	30.000, 74.000	Se une fuertemente a la Pol II; se une a TFIIB e impide la unión de Pol II a secuencias de DNA inespecíficas
TFIIH	12	35.000–89.000	Desenrolla el DNA en el promotor (actividad helicasa); fosforila Pol II (dentro de CTD); recluta el complejo de reparación por escisión de nucleótido.
Elongación*			
ELL†	1	80.000	
pTEFb	2	43.000, 124.000	Fosforila Pol II (dentro de CTD)
SII (TFIIS)	1	38.000	
Elongina (SIII)	3	15.000, 18.000, 110.000	

*La función de los factores de elongación es suprimir la pausa o detención de la transcripción del complejo Pol II-TFIIF.

†El nombre se deriva de *e*leven-nineteen *l*ysine-rich *l*eukemia. El gen del factor ELL es el lugar de acontecimientos de recombinación cromosómica asociados frecuentemente con la leucemia mieloide aguda.

drólisis de ATP), creándose así el complejo abierto. Considerando todas las subunidades de los diversos factores esenciales (excluyendo TFIIA), este conjunto activo mínimo contiene más de 30 polipéptidos. Los estudios estructurales de Roger Kornberg y colaboradores han proporcionado una imagen más detallada del núcleo de la RNA polimerasa II durante la elongación (Fig. 26–10c).

Inicio de la hebra de RNA y desalojo del promotor El TFIIH tiene una función adicional durante la fase de inicio. Una actividad quinasa de una de sus subunidades fosforila la Pol II en varios lugares del CTD (Fig. 26–10a). Otras proteína quinasas, entre las que se encuentra CDK9 (quinasa 9 dependiente de ciclina), que es parte del complejo pTEFb (factor *b* positivo de elongación de la transcripción), también fosforilan el CTD, principalmente en residuos Ser de la secuencia repetida del CTD. Ello provoca un cambio conformacional en el complejo, que tiene como consecuencia el inicio de la transcripción. La fosforilación del CTD también es importante durante la fase de elongación que sigue a continuación. El estado de fosforilación del CTD cambia a medida que progresa la transcripción. Los cambios afectan a las interacciones entre el complejo de transcripción y otras proteínas y enzimas, de modo que se fijan diferentes conjuntos de proteínas en el inicio que en fases posteriores. Algunas de estas proteínas intervienen en la maduración del transcrito (tal como se describe más adelante).

Durante la síntesis de los 60 a 70 nucleótidos iniciales del RNA se liberan primero el TFIIE y luego el TFIIH, mientras que Pol II inicia la fase de elongación de la transcripción.

Elongación, terminación y liberación El TFIIF permanece asociado a la Pol II durante toda la elongación. Durante esta etapa, la actividad de la polimerasa está muy potenciada por proteínas denominadas factores de elongación (Tabla 26–2). Los factores de elongación, algunos unidos al CTD fosforilado, suprimen las pausas durante la trascripción y también coordinan las interacciones entre los complejos proteicos responsables de la maduración postranscripcional de los mRNA. Una vez el transcrito de RNA ha sido completado, finaliza la transcripción. La Pol II se desfosforila y se recicla, para estar disponible para iniciar otro transcrito (Fig. 26–10a).

Regulación de la actividad de la RNA polimerasa II La regulación de la transcripción en los promotores de la Pol II es muy elaborada. Implica la interacción de numerosas proteínas con el complejo de preinicio. Algunas de estas proteínas reguladoras interaccionan con factores de transcripción; otras con la propia Pol II. La regulación de la transcripción se describe con más detalle en el Capítulo 28.

Las diversas funciones de TFIIH En los eucariotas la reparación del DNA dañado (véase la Tabla 25–5) de los genes que están siendo transcritos es más eficiente que la de otro DNA dañado y la hebra molde es reparada algo más eficientemente que la hebra que no actúa de molde. Estas sorprendentes observaciones encuentran explicación por las funciones alternativas de las subunidades del TFIIH. El TFIIH no sólo participa en la formación del complejo cerrado durante el ensamblaje de un complejo de transcripción (como se ha descrito anteriormente), sino que también algunas de sus subunidades son componentes

esenciales del complejo separado de reparación por escisión de nucleótido (véase la Fig. 25–26).

Cuando la transcripción por Pol II se detiene en una lesión del DNA, el TFIIH puede interaccionar con la lesión y reclutar el complejo completo de reparación por escisión de nucleótido. La pérdida genética de ciertas subunidades del TFIIH puede causar enfermedades en humanos. Algunos ejemplos son el xeroderma pigmentosum (véase el Recuadro 25–1) y el síndrome de Cockayne, caracterizado por retraso del crecimiento, fotosensibilidad y desórdenes neurológicos. ■

La RNA polimerasa dependiente de DNA es inhibida selectivamente

La elongación de las cadenas de RNA por la RNA polimerasa tanto en bacterias como en eucariotas es inhibida por el antibiótico **actinomicina D (Fig. 26–11)**. La porción plana de esta molécula se intercala en el DNA de doble hélice entre pares de bases G≡C sucesivos, deformando el DNA. Esta alteración impide el movimiento de la polimerasa a lo largo del molde. Debido a que la actinomicina D inhibe la elongación del RNA en células intactas así como en extractos celulares, resulta muy útil para identificar procesos celulares que dependen de la síntesis de RNA. La **acridina** inhibe la síntesis de RNA de forma similar (Fig. 26–11).

La **rifampicina** inhibe la síntesis de RNA en las bacterias uniéndose a la subunidad β de las RNA polimerasas bacterianas (Fig. 26–6), lo que impide el desalojo del promotor en la transcripción. Ocasionalmente se administra como antibiótico.

El hongo *Amanita phalloides* ha desarrollado un mecanismo de defensa muy efectivo frente a los depredadores. Produce **α-amanitina,** que impide la formación de mRNA en las células animales al bloquear la Pol II y, a concentraciones más altas, también la Pol III. Ni la Pol I ni la RNA polimerasa bacteriana son sensibles a la α-amanitina, como tampoco la propia RNA polimerasa II de *A. phalloides*.

RESUMEN 26.1 Síntesis de RNA dependiente de DNA

- La transcripción está catalizada por RNA polimerasas dependientes de DNA, que usan ribonucleósidos 5′-trifosfato para sintetizar RNA complementario de la hebra molde de un dúplex de DNA. La transcripción consta de varias fases: unión de la RNA polimerasa a un sitio del DNA denominado promotor, inicio de la síntesis del transcrito, elongación y terminación.
- La RNA polimerasa bacteriana requiere una subunidad específica para reconocer el promotor. Como primeros pasos determinantes de la transcripción, la unión de la RNA polimerasa al promotor y el inicio de la transcripción están estrechamente regulados. La transcripción se detiene en secuencias denominadas terminadores.
- Las células eucarióticas tienen tres tipos de RNA polimerasas. La unión de la RNA polimerasa II a sus promotores requiere un conjunto de proteínas denominadas factores de transcripción. Los factores de elongación participan en la fase de elongación de la transcripción. La subunidad mayor de la Pol II tiene un largo dominio carboxiloterminal, que se fosforila durante las fases de inicio y elongación.

26.2 Maduración del RNA

Gran parte de las moléculas de RNA en las bacterias y la práctica totalidad de las moléculas de RNA de los eucariotas son modificadas en mayor o menor medida después de su síntesis. Algunas de las transformaciones moleculares más interesantes del metabolismo del RNA ocurren durante el proceso posterior a la síntesis. Curiosamente, algunos de los enzimas que catalizan estas reacciones están compuestos por RNA en lugar de proteína. El descubrimiento de estos RNA catalíticos, o **ribozi-**

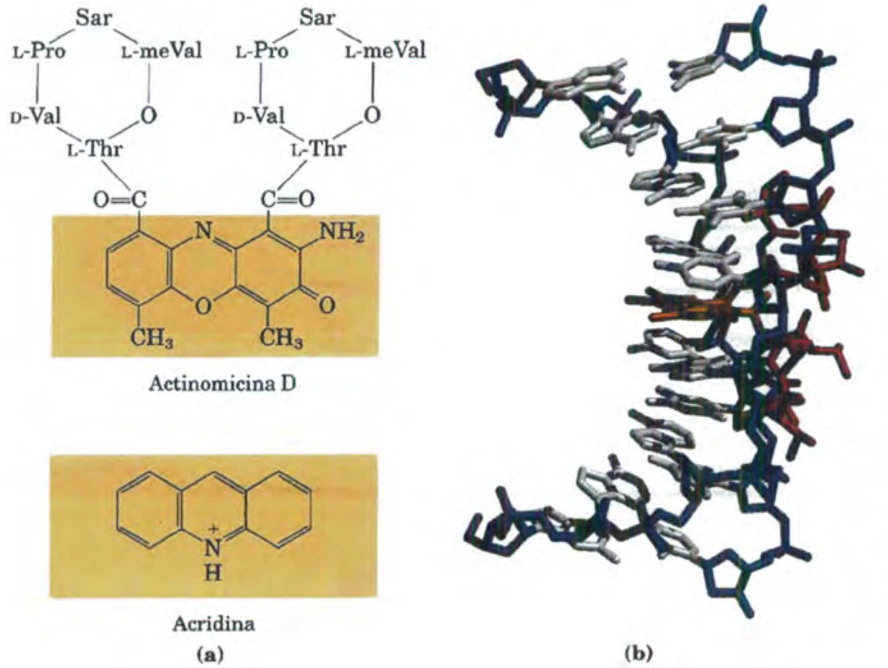


FIGURA 26–11 Actinomicina D y acridina, inhibidores de la transcripción del DNA. (a) La porción sombreada de la actinomicina D es plana y se intercala entre dos pares de bases sucesivos G≡C en el DNA dúplex. Las dos estructuras peptídicas cíclicas de la molécula de la actinomicina D se unen al surco menor de la doble hélice. La sarcosina (Sar) es la *N*-metilglicina; meVal representa metilvalina. La acridina también actúa por intercalación en el DNA. **(b)** Complejo de actinomicina D con DNA (PDB ID 1DSC). El esqueleto del DNA se muestra en azul, las bases en blanco, la parte intercalada de la actinomicina D (coloreada en **(a)**) en naranja y el resto de la actinomicina D en rojo. El DNA está curvado a consecuencia de la unión de la actinomicina.

mas, ha representado una revolución en las concepciones sobre la función del RNA y sobre el origen de la vida.

Una molécula de RNA recién sintetizada se denomina **transcrito primario.** Seguramente la modificación más extensiva de los transcritos primarios tenga lugar en los mRNA de los eucariotas y en los tRNA tanto de bacterias como de eucariotas. Los RNA con funciones especializadas también experimentan modificación.

El transcrito primario de un mRNA eucariótico contiene las secuencias que corresponden a un gen, aunque las secuencias que codifican el polipéptido puedan no ser contiguas. Los fragmentos que interrumpen la región codificante del transcrito se denominan intrones y los segmentos codificantes se llaman exones (véase la discusión sobre los intrones y los exones del DNA en el Capítulo 24).

En un proceso denominado **corte y empalme (splicing),** los intrones se eliminan del transcrito primario y los exones se unen para formar una secuencia continua que especifica un polipéptido funcional. Los mRNA eucarióticos también se modifican en ambos extremos. Un residuo modificado, denominado casquete 5′, se añade al extremo 5′. El extremo 3′ se corta y se le añaden unos 80 a 250 residuos de A para formar una "cola" de poli(A). Los a veces elaborados complejos proteicos que llevan a cabo estos tres procesos de maduración del RNA no operan independientemente, están asociados unos a otros y con la CDT fosforilada de la Pol II; cada complejo influye en la función de los otros. Otras proteínas implicadas en el transporte del mRNA al citoplasma también están asociadas con el mRNA en el núcleo y la modificación del transcrito está acoplado con su transporte. En efecto, un mRNA eucariótico a medida que es sintetizado entra a formar parte de un complejo que consta de docenas de proteínas. La composición del complejo cambia a medida que el transcrito es modificado, transportado al citoplasma y entregado a los ribosomas para la traducción. Estos procesos se resumen en la **Figura 26–12** y se describen con mayor detalle a continuación.

Los transcritos primarios de los tRNA de los procariotas y de los eucariotas también se modifican por eliminación de secuencias de cada extremo (corte) y en algunos casos por eliminación de intrones (corte y empalme). Muchas bases y azúcares del tRNA también son modificados; en el tRNA maduro abundan las bases que no se encuentran habitualmente en otros ácidos nucleicos (véase la Fig. 26–23). Muchos de los RNA con función especializada también experimentan elaborados procesos de maduración, que a menudo incluyen la eliminación de segmentos de uno o ambos extremos.

El destino final de todos los RNA es la degradación regulada y completa. La velocidad de recambio de los RNA es fundamental para determinar su nivel estacionario y con qué velocidad cesa la expresión de un gen cuyo producto ya no es necesario para la célula. Durante el desarrollo de los organismos pluricelulares, por ejemplo, es importante que ciertas proteínas se expresen solamente en una etapa, y que los RNA que las codifican sean sintetizados y destruidos en el momento adecuado.

Los mRNA eucarióticos llevan un casquete en el extremo 5′

La mayoría de mRNA eucarióticos tienen un **casquete en 5′,** un residuo de 7-metilguanosina unido al residuo 5′-terminal del mRNA a través de un enlace 5′,5′-trifosfato poco común **(Fig. 26–13).** El casquete en 5′ protege el mRNA de las ribonucleasas. El casquete también se une a un complejo proteico específico y participa en la unión del mRNA al ribosoma para iniciar la traducción (Capítulo 27).

El casquete 5′ se forma por condensación de una molécula de GTP con el trifosfato del extremo 5′ del transcrito. La guanina es metilada posteriormente en N-7 y a menudo se añaden grupos metilo adicionales en los 2′ hidroxilos del primer y segundo nucleótidos adyacentes al casquete (Fig. 26–13a). Los grupos metilo proceden de la *S*-adenosilmetionina. Todas estas reacciones suceden en los primeros estadios de la transcripción, después de añadir los primeros 20 o 30 nucleótidos del transcrito. Los tres enzimas responsables de la inserción del casquete, y por su mediación el extremo 5′ del propio transcrito, están asociados al CTD de la RNA polimerasa II hasta que se sintetiza el casquete. Entonces

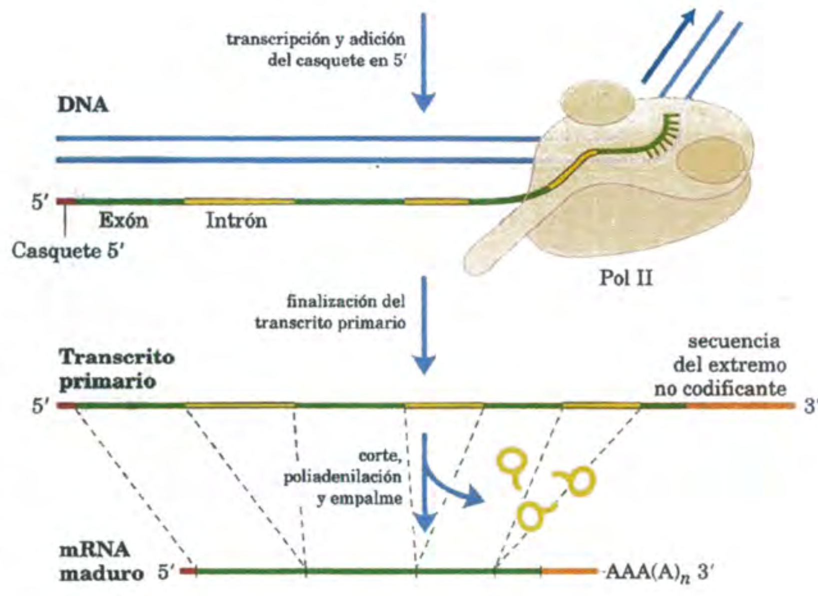


FIGURA 26–12 Formación del transcrito primario y su modificación durante la maduración del mRNA en una célula eucariótica. El casquete 5′ (en rojo) se añade antes de que se complete la síntesis del transcrito primario. En naranja se muestra una secuencia no codificante (intrón), a continuación del último exón. El corte y empalme puede tener lugar antes o después de las etapas de corte y poliadenilación. Todos los procesos aquí representados tienen lugar en el núcleo.

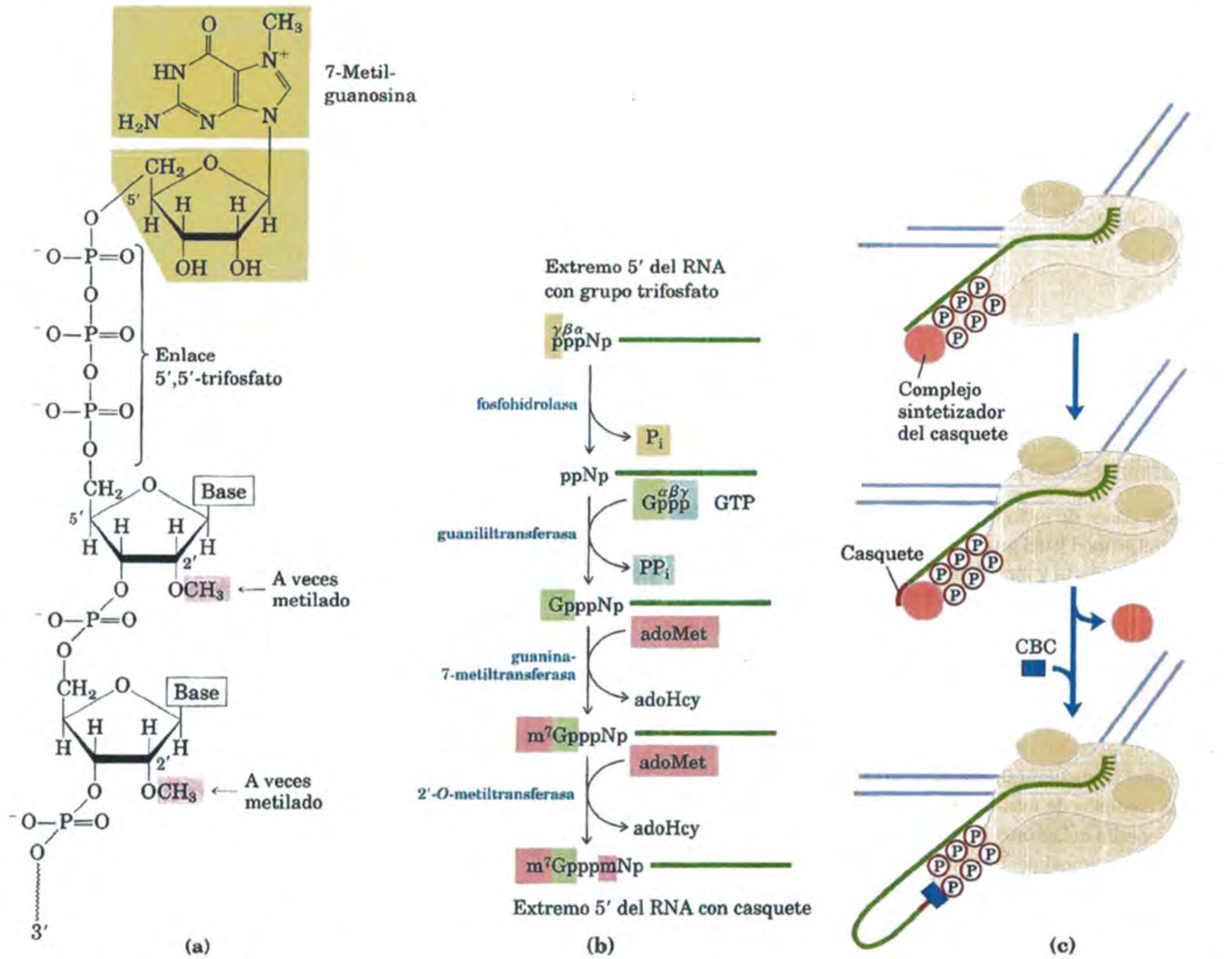


FIGURA 26–13 El casquete en 5′ del mRNA. (a) La 7-metilguanosina (m^7G) se une al extremo 5′ de casi todos los mRNA eucarióticos con un poco usual enlace 5′,5′-trifosfato. Se encuentran a menudo grupos metilo (en rosa) en la posición 2′ del primer y segundo nucleótidos. Los RNA de las levaduras carecen de los grupos 2′-metilo. El 2′-metilo del segundo nucleótido generalmente sólo se encuentra en los RNA de las células de vertebrados. **(b)** La formación del casquete en 5′ precisa de cuatro a cinco pasos diferentes (adoHcy es *S*-adenosilhomocisteína). **(c)** La síntesis del casquete la realizan enzimas anclados al CTD de Pol II. El casquete permanece ligado al CTD a través de la asociación con el complejo de unión al casquete (CBC).

los enzimas de formación del casquete se separan del extremo 5′ y se une el complejo de unión al casquete (Fig. 26–13c).

Intrones y exones son transcritos del DNA al RNA

En las bacterias, una cadena polipeptídica está codificada generalmente por una secuencia de DNA que es colineal con la secuencia de aminoácidos, que se extiende sin interrupción a lo largo del molde de DNA hasta completar la información necesaria para especificar el polipéptido. Sin embargo, la noción de que *todos* los genes son continuos fue desmentida cuando en 1977 Phillip Sharp y Richard Roberts descubrieron independientemente que en los eucariotas muchos genes de los polipéptidos están interrumpidos por secuencias no codificantes (intrones).

La gran mayoría de los genes de los vertebrados contienen intrones; entre las pocas excepciones se encuentran los genes que codifican las histonas. La presencia de intrones en otros eucariotas es variable. La mayoría de genes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* carecen de intrones, si bien son más frecuentes en los genes de otras especies de levadura. Los intrones también se encuentran en unos pocos genes de bacterias y arqueobacterias. Los intrones del DNA son transcritos junto con el resto del gen por las RNA polimerasas. A continuación, los intrones del transcrito primario de RNA son cortados y los exones empalmados para formar un RNA maduro y funcional. En los mRNA de los eucariotas, la mayoría de los exones tienen menos de 1.000 nucleótidos de longitud y una gran parte se encuentra en el intervalo de 100 a 200 nucleótidos; codifican, por tanto, cadenas polipeptídicas de 30 a 60 aminoácidos de longitud, dentro de un polipéptido de mayor longitud. El tamaño de los intrones varía entre 50 y 20.000 nucleótidos. Los genes de los eucariotas superiores, incluidos los humanos, tienen generalmente mucho más DNA en los intrones que en los exones. Muchos genes tienen intrones; algunos genes tienen docenas de ellos.

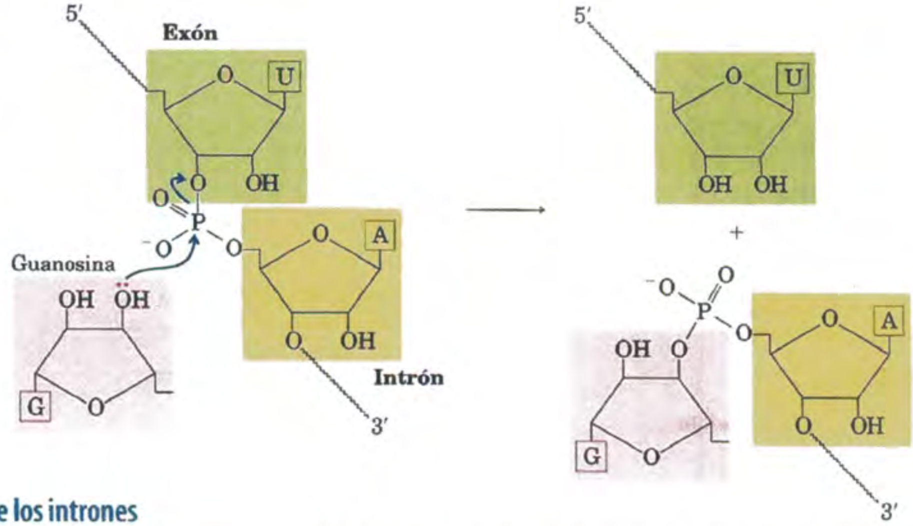


FIGURA 26–14 Una reacción de transesterificación. Aquí se muestra el primer paso en el corte y empalme de los intrones del grupo I. El 3′ OH de una molécula de guanosina actúa de nucleófilo, atacando el enlace fosfodiéster entre los residuos U y A en el límite exón-intrón de una molécula de mRNA (véase la Fig. 26–15).

El RNA cataliza el corte y empalme de los intrones

Hay cuatro clases de intrones. Las dos primeras, denominadas intrones del grupo I y del grupo II, difieren en los detalles de sus mecanismos de corte y empalme, pero comparten una característica sorprendente: son *autocatalíticos* (no son necesarios enzimas proteicos). Los intrones del grupo I se encuentran en algunos genes nucleares, mitocondriales y de cloroplastos que codifican rRNA, mRNA y tRNA. Los intrones del grupo II se encuentran generalmente en los transcritos primarios de los mRNA de mitocondrias o cloroplastos, en hongos, algas y plantas. También se encuentran intrones del grupo I y del grupo II en los raros ejemplos de intrones bacterianos. Ninguno de los dos grupos necesita cofactores de alta energía (tales como el ATP) para el corte y empalme. En ambos grupos, los mecanismos de corte y empalme incluyen dos reacciones de transesterificación **(Fig. 26–14)**, en las que un grupo 2′- o 3′-hidroxilo de una ribosa realiza un ataque nucleofílico sobre un fósforo, formándose en cada paso un nuevo enlace fosfodiéster a expensas del anterior, con lo cual se mantiene el balance energético. Estas reacciones son muy parecidas a las reacciones de rotura y unión del DNA catalizadas por las topoisomerasas (véase la Fig. 24–21) y las recombinasas específicas de sitio (véase la Fig. 25–40).

La reacción de corte y empalme del grupo I requiere un nucleósido de guanina o un cofactor nucleotídico, pero el cofactor no se utiliza como fuente de energía, sino que el grupo 3′-hidroxilo de la guanosina se utiliza como nucleófilo en el primer paso de la ruta de corte y empalme. El grupo 3′-hidroxilo de la guanosina forma un enlace 3′,5′-fosfodiéster normal con el extremo 5′ del intrón **(Fig. 26–15)**. El 3′-hidroxilo del exón

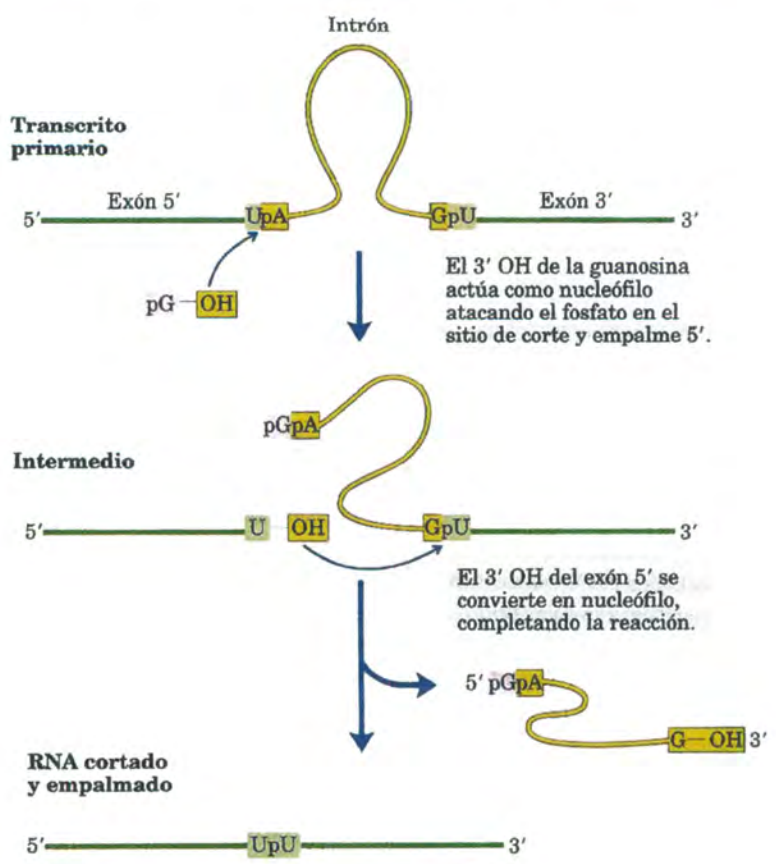


FIGURA 26–15 Mecanismo de corte y empalme de los intrones del grupo I. El nucleófilo del primer paso puede ser guanosina, GMP, GDP o GTP. El intrón escindido es finalmente degradado.

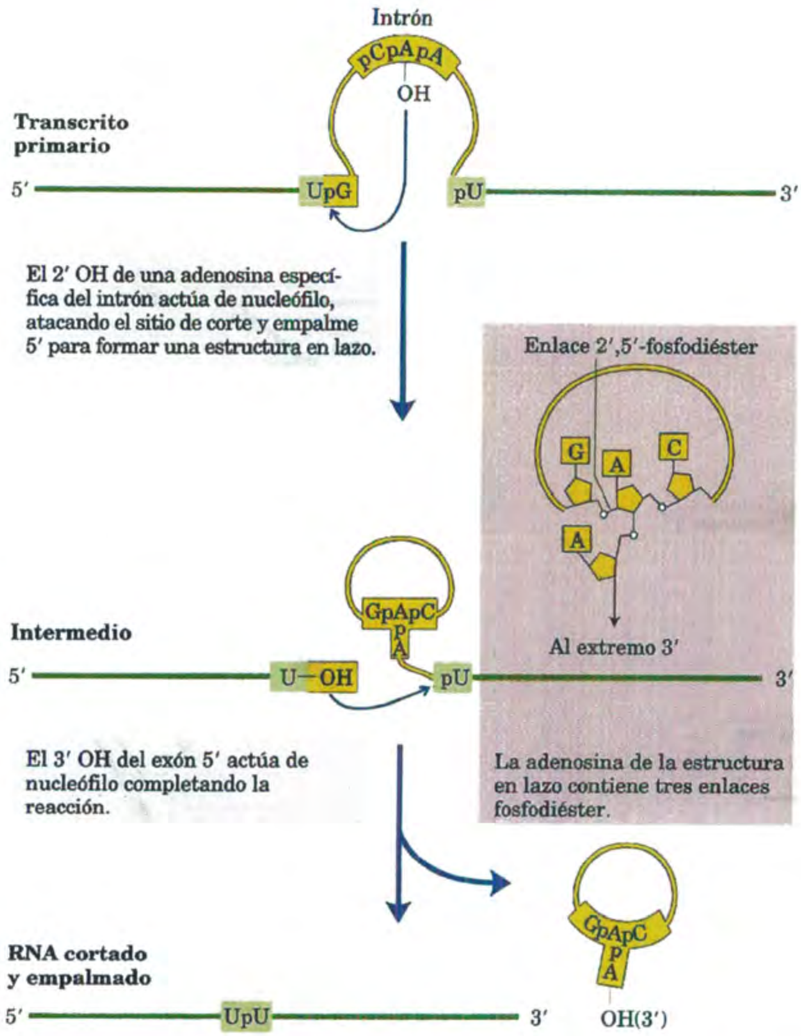


FIGURA 26–16 Mecanismo de corte y empalme de los intrones del grupo II. La química es similar a la del corte y empalme de los intrones del grupo I, excepto en la identidad del nucleófilo del primer paso y en la formación de un intermedio tipo lazo con una ramificación con un enlace 2′,5′-fosfodiéster.

desplazado en este paso actúa seguidamente como nucleófilo en una reacción similar en el extremo 3′ del intrón. El resultado es la escisión exacta del intrón y la ligación de los exones.

En los intrones del grupo II el patrón de reacción es similar excepto para el nucleófilo del primer paso, que en este caso es el grupo 2′-hidroxilo de un residuo de A situado *dentro* del intrón **(Fig. 26–16)**. Se produce un intermedio ramificado con una estructura en forma de lazo.

El autocorte y empalme de los intrones fue descubierto en 1982 en los estudios sobre el mecanismo de corte y empalme del intrón de grupo I del rRNA del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* llevados a cabo por Thomas Cech y colaboradores. Estos investigadores transcribieron in vitro DNA aislado de *Tetrahymena* (incluido el intrón) utilizando RNA polimerasa bacteriana purificada. El RNA resultante se cortaba y empalmaba a sí mismo con precisión sin la participación de ninguna proteína enzimática de *Tetrahymena*. El descubrimiento de que los RNA podían tener funciones catalíticas fue una importante contribución en la compresión de los sistemas biológicos.

Thomas Cech

La mayoría de intrones *no* experimentan autocorte y empalme y no se designan por un número de grupo. La tercera y más numerosa clase de intrones se encuentra en los transcritos primarios del mRNA nuclear. Se denominan **intrones de espliceosoma,** porque su eliminación ocurre en el interior y por acción de un gran complejo proteico denominado **espliceosoma.** En el espliceosoma, los intrones experimentan corte y empalme por el mismo mecanismo de formación de lazo de los intrones del grupo II. El espliceosoma está formado por complejos RNA-proteína especializados, denominados *p*equeñas *r*ibo*n*ucleo*p*roteínas nucleares (snRNP). Cada snRNP contiene un RNA de 100 a 200 nucleótidos de un tipo denominado **RNA nuclear pequeño (snRNA).** En los núcleos eucarióticos se encuentran generalmente cinco snRNA (U1, U2, U4, U5 y U6) implicados en las reacciones de corte y empalme. Los RNA y las proteínas de las snRNP están muy conservados en los eucariotas, de las levaduras a los humanos. **Corte y empalme del mRNA**

Los intrones de espliceosoma tienen generalmente los dinucleótidos GU y AG en los extremos 5′ y 3′, respectivamente, que marcan el sitio de corte y empalme. El snRNA U1 contiene una secuencia complementaria de secuencias próximas al sitio 5′ de corte y empalme de los intrones de los mRNA nucleares **(Fig. 26–17a)**, y la snRNP con U1se une a esta región del tránscrito primario. La adición de snRNP con U2, U4, U5 y U6

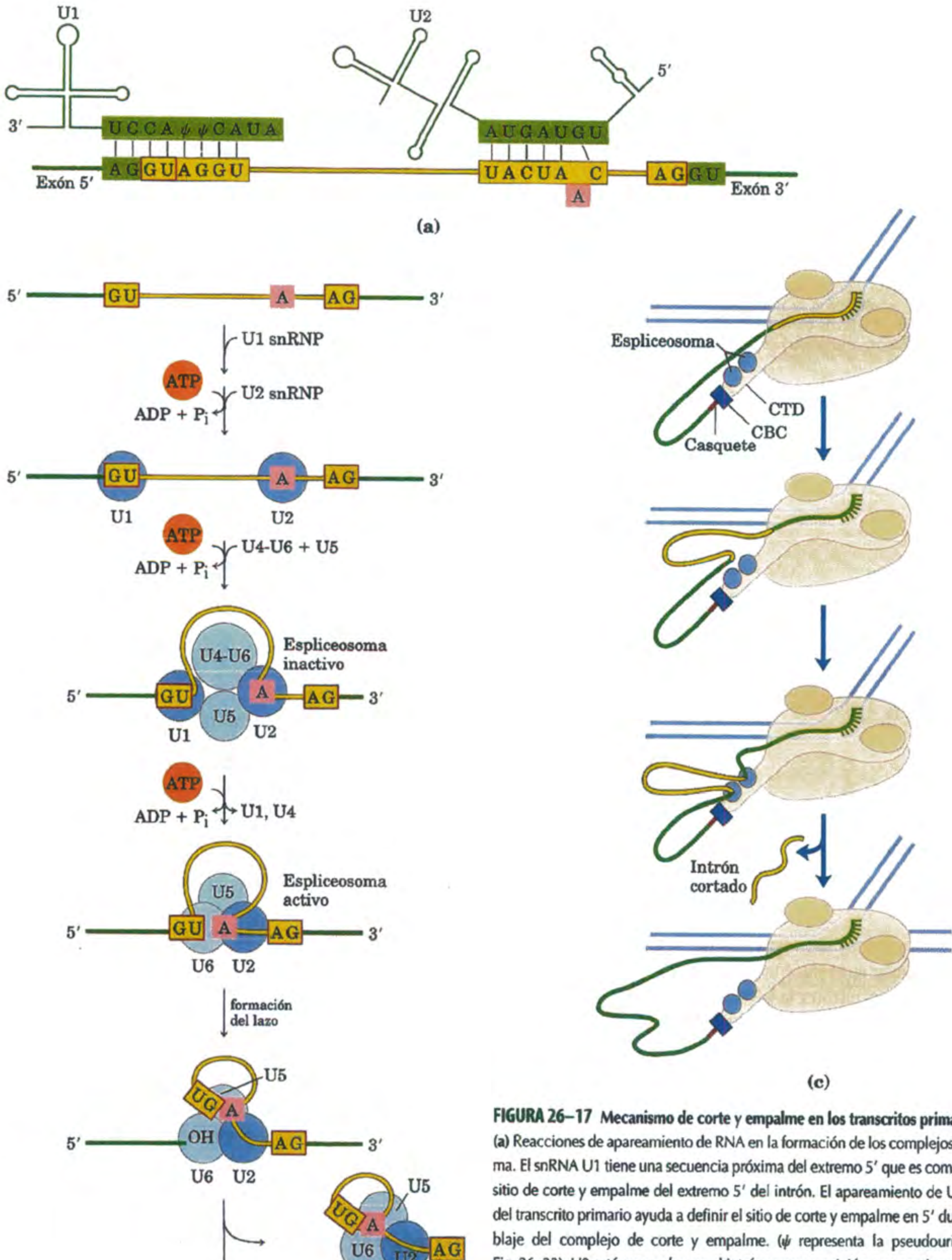


FIGURA 26–17 Mecanismo de corte y empalme en los transcritos primarios de mRNA. **(a)** Reacciones de apareamiento de RNA en la formación de los complejos del espliceosoma. El snRNA U1 tiene una secuencia próxima del extremo 5′ que es complementaria del sitio de corte y empalme del extremo 5′ del intrón. El apareamiento de U1 a esta región del transcrito primario ayuda a definir el sitio de corte y empalme en 5′ durante el ensamblaje del complejo de corte y empalme. (ψ representa la pseudouridina; véase la Fig. 26–23). U2 está apareado con el intrón en una posición que contiene el residuo de A (de color rosa) que actúa de nucleófilo durante la reacción de corte y empalme. El apareamiento del snRNA U2 produce una protuberancia que desplaza y ayuda a activar la adenosina, cuyo 2′ OH formará la estructura en lazo mediante un enlace 2′,5′-fosfodiester.

(b) Ensamblaje de los espliceosomas. Primero se unen los snRNP U1 y U2, y a continuación se unen los restantes snRNP (el complejo U4–U6 y U5) para formar un espliceosoma inactivo. Reordenamientos internos convierten esta especie en un espliceosoma activo, del cual han sido descartados U1 y U4 y donde U6 está apareado simultáneamente con el lugar de corte en 5′ y con U2. A continuación siguen las etapas catalíticas, similares a las de los intrones del grupo II (véase la Fig. 26–16).

(c) La coordinación del corte y empalme y la transcripción sugiere un atractivo mecanismo para unir los dos sitios de corte. Véase el texto para más detalles.

conduce a la formación del espliceosoma (Fig. 26–17b). En conjunto las snRNP contribuyen al espliceosoma con 5 RNA y unas 50 proteínas, formando un agregado supramolecular casi tan complejo como el ribosoma (descrito en el Capítulo 27). Quizá unas 50 proteínas más están asociadas con el espliceosoma en diferentes momentos del proceso de corte y empalme, en el que algunas de estas proteínas tienen múltiples funciones: en el corte y empalme, transporte del mRNA al citoplasma, traducción y degradación final del mRNA. Para el ensamblaje del complejo de corte y empalme se requiere ATP, pero no parece que las reacciones de corte y empalme lo necesiten. Algunos intrones de mRNA son cortados y empalmados por un tipo menos común de complejo de corte y empalme, en el que las snRNP con U1 y con U2 son reemplazadas por snRNP con U11 y U12. Mientras que los espliceosomas que contienen U1 y U2 eliminan los intrones con secuencias terminales (5′)GU y AG(3′), como se muestra en la Figura 26–17, los espliceosomas con U11 y U12 eliminan una clase rara de intrones que tienen secuencias terminales (5′)AU y AC(3′) para marcar los sitios de corte y empalme del intrón. Los espliceosomas utilizados en el procesamiento del mRNA nuclear pueden haber evolucionado a partir de los intrones más antiguos del grupo II, por sustitución de los dominios ancestrales de autocorte y empalme por las snRNP.

Algunos componentes de la maquinaria de corte y empalme se encuentran unidos a la CTD de la RNA polimerasa II; ello sugiere un interesante modelo de la reacción de corte y empalme (Fig. 26–17c). Así que se ha sintetizado el primer punto de corte, se une a un espliceosoma anclado. Acto seguido, el segundo punto de corte es capturado a su paso por el complejo, facilitando la yuxtaposición de los extremos del intrón y el subsiguiente proceso de corte y empalme. Después del corte y empalme, el intrón permanece en el núcleo y es finalmente degradado.

La cuarta clase de intrones, que se encuentra en ciertos tRNA, se distingue de los intrones de los grupos I y II en que el corte y empalme requiere ATP y una endonucleasa. La endonucleasa de corte y empalme corta los enlaces fosfodiéster en ambos extremos del intrón y los dos exones se unen por un mecanismo similar al de la reacción de la DNA ligasa (véase la Fig. 25–17).

Aunque los intrones de espliceosoma están aparentemente limitados a los eucariotas, las otras clases de intrones no lo están. Se han encontrado genes con intrones del grupo I y del grupo II en las bacterias y en los virus bacterianos. El bacteriófago T4, por ejemplo, tiene varios genes que codifican proteínas con intrones del grupo I. Los intrones son más frecuentes en las arqueobacterias que en las bacterias.

Los mRNA eucarióticos tienen una estructura característica en el extremo 3′

La mayor parte de mRNA eucarióticos tiene una serie de 80 a 250 residuos de A en el extremo 3′ que forman la **cola de poli(A).** Esta cola sirve de lugar de unión de una o más proteínas específicas. La cola de poli(A) y sus proteínas asociadas probablemente ayudan a proteger el mRNA de la destrucción enzimática. Muchos mRNA bacterianos también adquieren colas de poli(A), pero estas colas estimulan la degradación del mRNA en lugar de protegerlo.

La cola de poli(A) es añadida en un proceso que consta de múltiples etapas. El transcrito se extiende más allá del sitio donde debe añadirse la cola de poli(A) y a continuación es cortado en el sitio de adición del poli(A) por un componente endonucleasa de un gran complejo enzimático, de nuevo asociado a la CTD de la RNA polimerasa II **(Fig. 26–18)**. El sitio del mRNA en donde se produce el corte y la adición de poli(A) está indicado por dos secuencias: la secuencia (5′)AAUAAA(3′), altamente conservada, situada de 10 a 30 nucleótidos en el lado 5′ (corriente arriba) del sitio de corte, y una secuencia peor definida, rica en residuos de G y U, situada de 20 a 40 nucleótidos co-

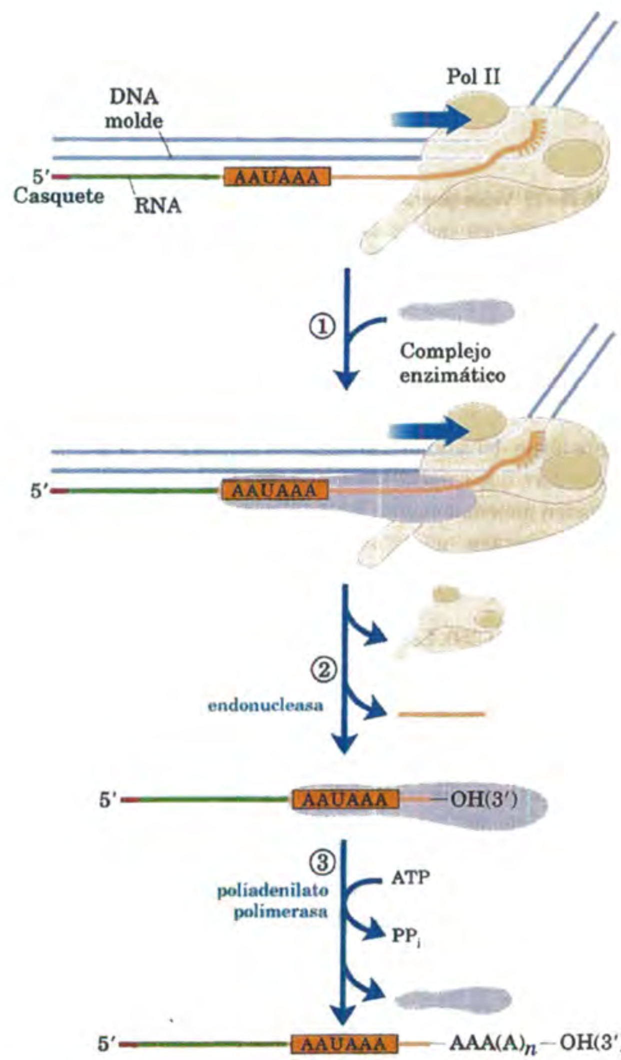


FIGURA 26–18 Adición de la cola de poli(A) al transcrito primario de RNA de los eucariotas. Pol II sintetiza RNA más allá del segmento del transcrito que contiene las secuencias señal para el corte, incluida la secuencia altamente conservada corriente arriba (5′)AAUAAA. ① A la secuencia señal para el corte se une un complejo enzimático que incluye una endonucleasa, una poliadenilato polimerasa y varias proteínas multiméricas implicadas en el reconocimiento de secuencias, el estímulo del corte y la regulación de la longitud de la cola de poliA. ② El RNA es cortado por la endonucleasa en un punto que se encuentra de 10 a 30 nucleótidos en el lado 3′ (más abajo) de la señal AAUAAA. ③ La poliadenilato polimerasa sintetiza una cola de poli(A) de 80 a 250 nucleótidos, que empieza en el sitio de corte.

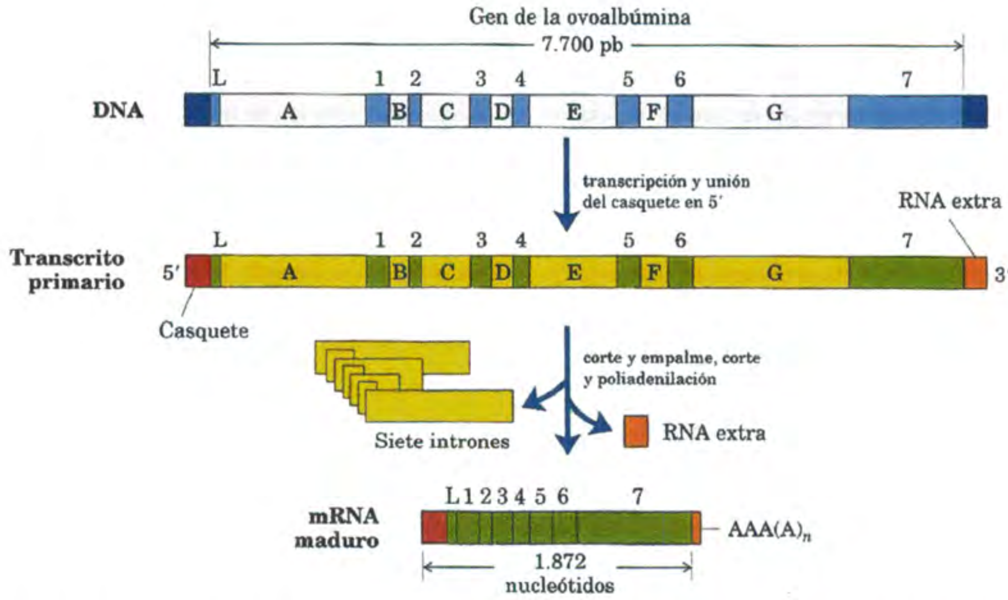


FIGURA 26–19 Visión general de la modificación de un mRNA eucariótico. El gen de la ovoalbúmina aquí mostrado tiene los intrones de A a G, los exones de 1 a 7 y L (L codifica la secuencia de un péptido señal que marca la proteína para la exportación fuera de la célula; véase la Fig. 27–38). Alrededor de tres cuartas partes del RNA son eliminadas durante la maduración. Pol II extiende el transcrito primario bastante más allá del sitio de corte y de poliadenilación ("RNA extra") antes de terminar la transcripción. Las señales de terminación de la Pol II todavía no han sido determinadas.

rriente abajo del sitio de corte. El corte genera el grupo 3′-hidroxilo libre que caracteriza el extremo final del mRNA, al que se añaden inmediatamente los residuos de A por la **poliadenilato polimerasa,** que cataliza la reacción

$$\text{RNA} + n\text{ATP} \longrightarrow \text{RNA}-(\text{AMP})_n + n\text{PP}_i$$

donde $n = 80$ a 250. Este enzima no requiere molde, pero necesita un mRNA cortado como cebador.

La **Figura 26–19** resume la maduración global de un mRNA eucariótico típico. En algunos casos también se modifica la región del mRNA que codifica el polipéptido, que experimenta un proceso de "edición" (véanse los detalles en la Sección 27.1). La edición comprende procesos que añaden o eliminan bases en las regiones codificantes de los transcritos primarios o que cambian la secuencia (por ejemplo, la desaminación enzimática de un residuo de C para dar un residuo de U). Un ejemplo notable ocurre en los protozoos parásitos conocidos como tripanosomas: grandes fragmentos de un mRNA se sintetizan sin uridilato, que es añadido más tarde durante la edición del RNA.

La modificación diferencial del RNA puede dar lugar a múltiples productos a partir de un gen

Una de las paradojas de la genómica moderna es que la complejidad aparente de los organismos no guarda relación con el número de genes que codifican proteínas o incluso con la cantidad de DNA genómico (p. 323). Sin embargo, el énfasis tradicional en los genes que codifican proteínas ignora la complejidad del transcriptoma de los organismos. A medida que las funciones del RNA se conocen mejor, se ponen de manifiesto nuevos aspectos de la complejidad del genoma.

Algunos transcritos de mRNA eucarióticos producen un único mRNA maduro y un único polipéptido; en cambio, otros pueden ser modificados de más de una manera para producir *diferentes* mRNA y, por lo tanto, diferentes polipéptidos. El transcrito primario tiene señales moleculares para todas las rutas alternativas de maduración. La ruta favorecida en una célula determinada depende de los factores de modificación, proteínas de unión al RNA que promueven una ruta determinada.

Los transcritos complejos pueden tener más de un sitio de corte y poliadenilación, patrones de corte y empalme alternativos, o ambos. Si existen dos o más sitios de corte y poliadenilación, la utilización del más próximo al extremo 5′ elimina un fragmento mayor de la secuencia del transcrito primario **(Fig. 26–20a)**. Este mecanismo, denominado elección del sitio de adición del poli(A), genera diversidad en los dominios variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (véase la Fig. 25–46). Patrones de corte y empalme alternativos (Fig. 26–20b) producen a partir de un transcrito primario común tres formas diferentes de la cadena pesada de la miosina durante el desarrollo de la mosca del vinagre. *Ambos* mecanismos contribuyen a la modificación diferencial de un único transcrito de RNA para dar lugar a dos hormonas diferentes en la rata: la hormona reguladora del calcio, la calcitonina, en el tiroides y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en el cerebro **(Fig. 26–21)**. Existen otros muchos patrones de corte y empalme alternativos **(Fig. 26–22)**, que aumentan sustancialmente el número de proteínas codificadas por los genes. Estos mismos procesos desempeñan un papel mucho menor en el caso de los eucariotas inferiores, con sólo unos pocos genes sujetos a corte y empalme alternativo en levadura.

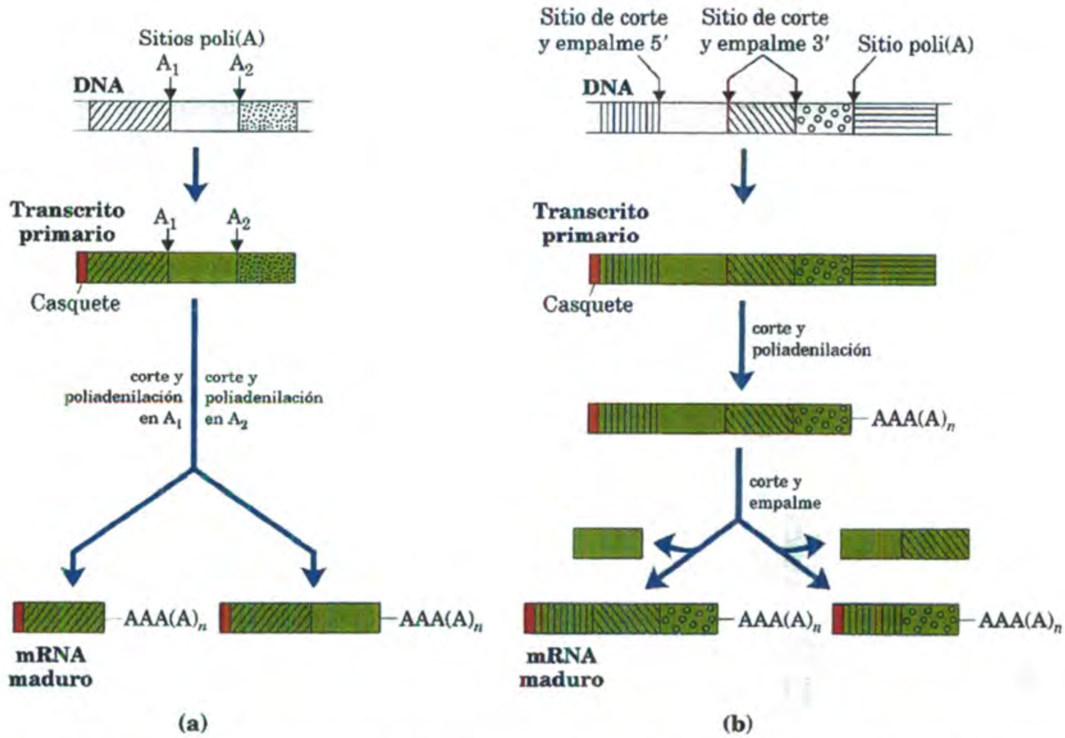


FIGURA 26–20 Dos mecanismos para la maduración alternativa de transcritos complejos en los eucariotas. (a) Patrones de corte y de poliadenilación alternativos. Se muestran dos sitios de poli(A), A_1 y A_2. **(b)** Patrones de corte y empalme alternativos. Se muestran dos sitios diferentes de corte en 3′. En ambos mecanismos se forman diferentes mRNA maduros a partir del mismo transcrito primario.

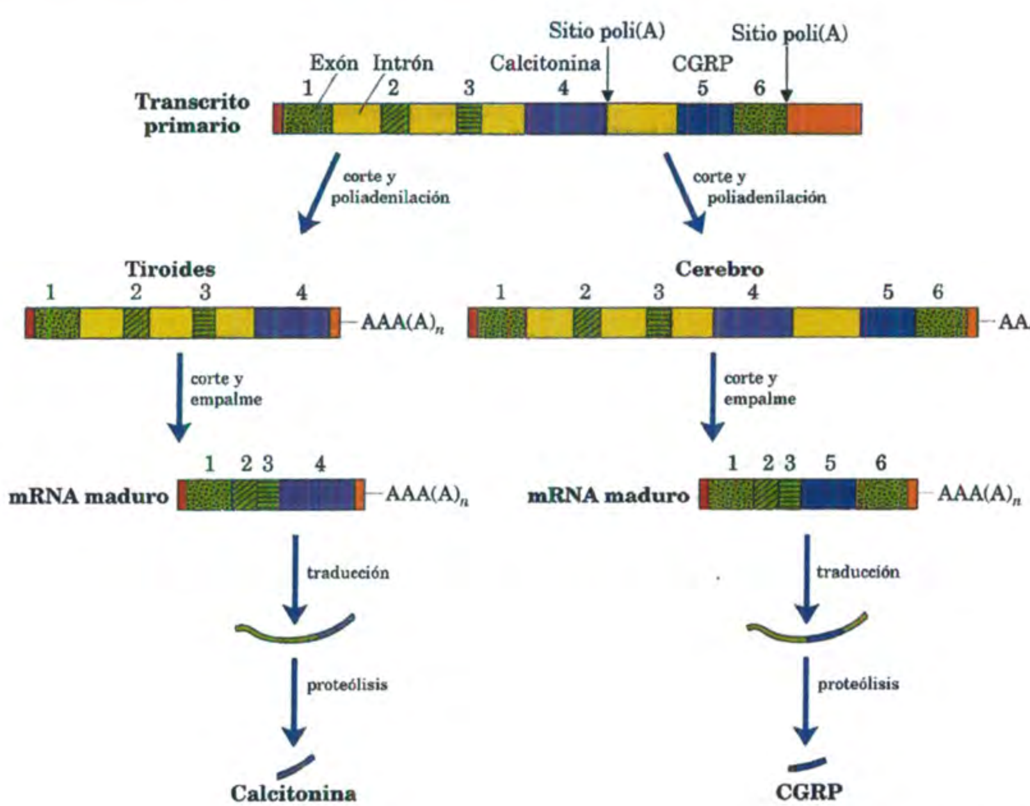


FIGURA 26–21 Maduración alternativa del transcrito del gen de la calcitonina en ratas. El transcrito primario tiene dos sitios de poli(A); uno predomina en el tiroides y el otro en el cerebro. El corte y empalme en el cerebro elimina el exón de la calcitonina (exón 4), mientras que en el tiroides este exón se conserva. Los péptidos resultantes continúan su maduración hasta dar los productos hormonales finales: el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en el cerebro y la calcitonina en el tiroides.

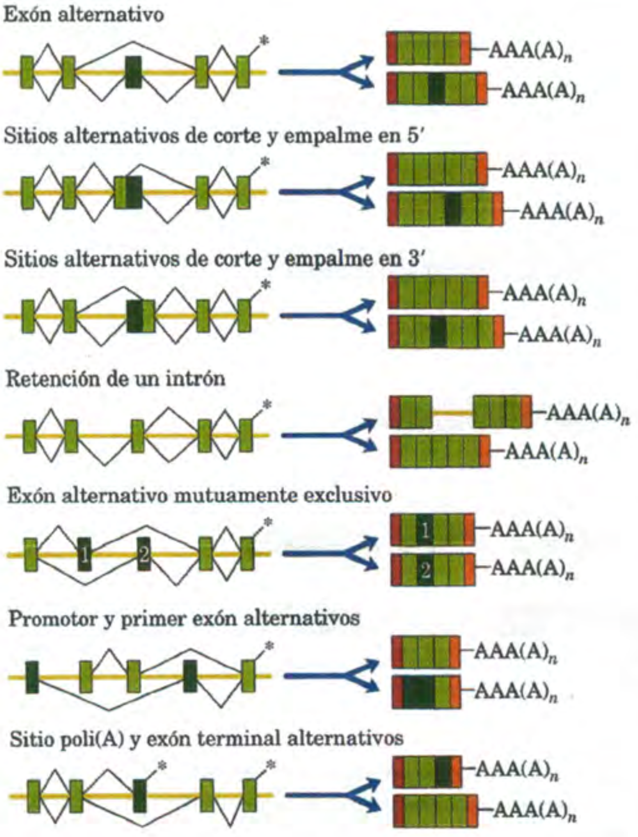


FIGURA 26–22 Resumen de patrones de corte y empalme. Los exones se muestran en diferentes tonos de verde y los intrones/regiones no traducidas como líneas amarillas. Las posiciones donde se añade poliadenosina se indican con asteriscos. Los exones unidos con alguna modalidad de corte y empalme están unidos por líneas negras. Los patrones de unión alternativos por encima y por debajo del transcrito dan lugar a los mRNA producto del corte y empalme superior e inferior, respectivamente. Las cajas rojas y naranja de los productos son las regiones del casquete en 5′ y 3′ no traducidas, respectivamente.

Los RNA ribosómicos y los tRNA también son modificados

La maduración postranscripción no se limita al mRNA. Los RNA ribosómicos, de células bacterianas, arqueobacterianas y eucarióticas, se forman a partir de precursores más largos, denominados **RNA prerribosómicos,** o pre-rRNA. Los RNA de transferencia igualmente proceden de precursores más largos. Estos RNA también pueden contener diversos nucleósidos modificados; en la **Figura 26–23** se muestran algunos ejemplos de ello.

RNA ribosómicos En las bacterias, los rRNA 16S, 23S y 5S (y algunos tRNA, aunque la mayoría de los tRNA están codificados en otros lugares) proceden de un único precursor 30S de unos 6.500 nucleótidos. Durante la maduración se elimina RNA en ambos extremos del precursor 30S y segmentos entre los rRNA **(Fig. 26–24)**. Los rRNA 16S y 23S contienen nucleósidos modificados. En *E. coli*, el rRNA 16S contiene 11 modificaciones, una pseudouridina y diez nucleósidos metilados en la base o en el grupo 2′-hidroxilo o en ambos. El rRNA 23S tiene 10 pseudouridinas, 1 dihidrouridina y 12 nucleósidos metilados. En las bacterias, cada modificación está generalmente catalizada por un enzima distinto. Las reacciones de metilación utilizan *S*-adenosilmetionina como cofactor. No se necesita ningún cofactor para la formación de pseudouridina.

El genoma de *E. coli* codifica siete moléculas de pre-rRNA. Todos estos genes tienen las regiones codificantes de RNA esencialmente idénticas, pero difieren en los segmentos entre los genes. El segmento entre los genes de rRNA 16S y 23S generalmente codifica uno o dos tRNA, originándose diferentes tRNA de los diferentes transcritos de pre-rRNA. También se encuentran secuencias codificantes de tRNA en el lado 3′ del rRNA 5S en algunos transcritos precursores.

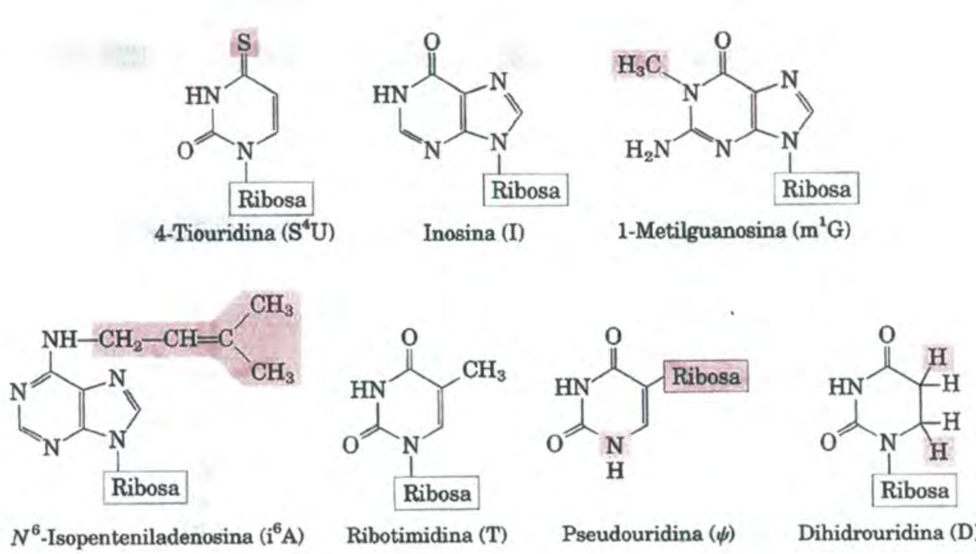


FIGURA 26–23 Algunas de las bases modificadas de los rRNA y tRNA, producidas en reacciones postranscripción. Los símbolos estándar se muestran entre paréntesis. Observe el punto de unión poco usual de la ribosa en la pseudouridina. Ésta es una pequeña muestra de los 96 nucleósidos modificados presentes en diferentes especies de RNA, con 81 tipos diferentes conocidos en los tRNA y 30 en los rRNA observados hasta la fecha. Puede encontrarse una lista completa de estas bases modificadas en el banco de datos de modificaciones del RNA (http://library.med.utah.edu/RNAmods/).

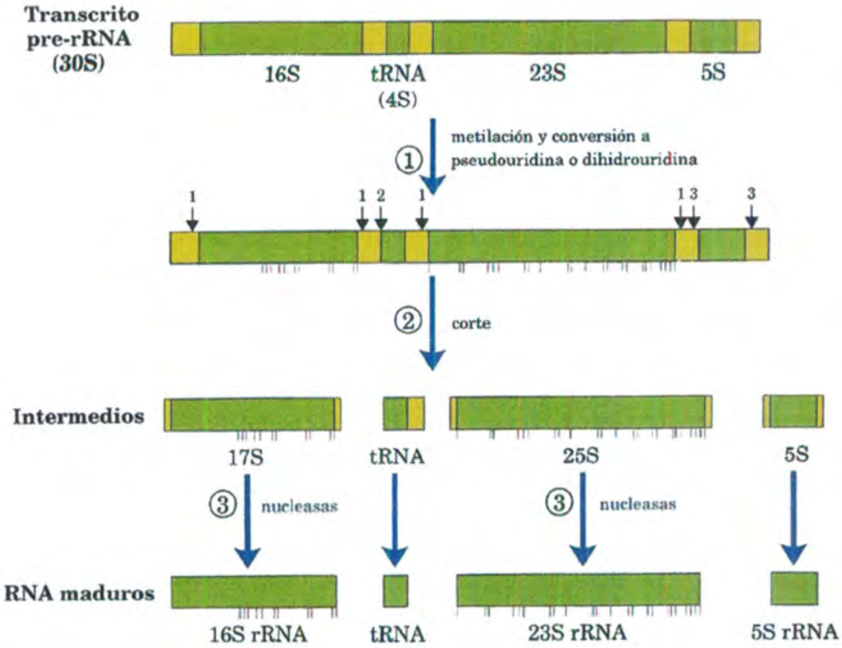


FIGURA 26–24 Maduración de transcritos de pre-rRNA en las bacterias. ① Antes del corte el precursor de RNA 30S es metilado en bases específicas (marcas rojas finas) y algunos residuos de uridina se convierten en pseudouridina (marcas azules finas) o dihidrouridina (marcas negras finas). Las reacciones de metilación son de múltiples tipos; algunas ocurren en las bases y otras en los grupos 2′-hidroxilo. ② El corte libera precursores de los rRNA y tRNA. El corte en los puntos marcados como 1, 2 y 3 es llevado a cabo por los enzimas RNasa III, RNasa P y RNasa E, respectivamente. Tal como se describe en el texto, la RNasa P es un ribozima. ③ Los rRNA finales, 16S, 23S y 5S, resultan de la acción de una variedad de nucleasas específicas. Las siete copias del gen del pre-rRNA difieren en número, localización e identidad de los tRNA incluidos en el transcrito primario. Algunas copias del gen tienen segmentos génicos de tRNA adicionales entre los segmentos de rRNA 16S y 23S y en el extremo 3′ más alejado del transcrito primario.

En los eucariotas la situación es más compleja. Un transcrito de pre-rRNA de 45S es sintetizado por la RNA polimerasa I y modificado en el nucleolo para dar los rRNA 18S, 28S y 5,8S, característicos de los ribosomas eucarióticos **(Fig. 26–25)**. Como en las bacterias, la maduración consiste en reacciones de corte por endo o exorribonucleasas y en reacciones de modificación de nucleósidos. Algunos pre-rRNA también contienen intrones que se han de cortar y empalmar. El proceso comienza en el nucleolo, en grandes complejos que se forman sobre el precursor de rRNA a medida que es sintetizado por la Pol I. La transcripción del rRNA, la maduración del rRNA y el ensamblaje de los ribosomas en el nucleolo están perfectamente coordinados. Cada complejo contiene las ribonucleasas que cortan el precursor de rRNA, los enzimas que modifican determinadas bases, numerosos **RNA nucleolares pequeños,** o **snoRNA,** que guían las modificaciones de los nucleósidos, y algunas reacciones de corte y proteínas ribosómicas. En la levadura, el conjunto del proceso comprende el pre-rRNA, más de 170 proteínas no ribosómicas, snoRNA para cada una de las modificaciones de nucleótidos (unas 70 en total, pues algunos snoRNA guían dos

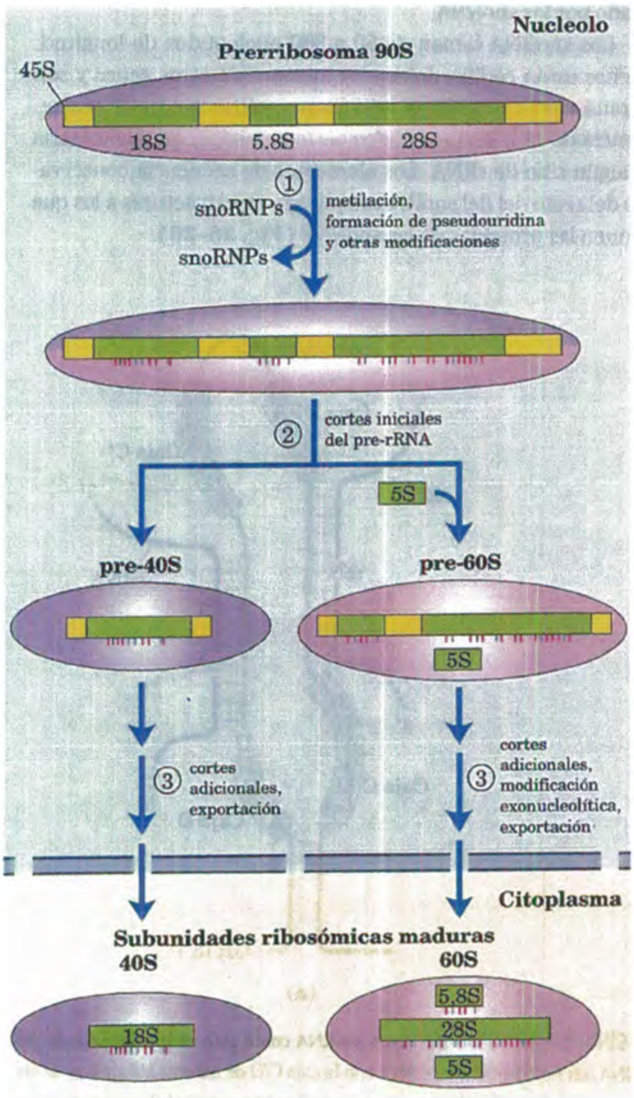


FIGURA 26–25 Maduración de los transcritos de pre-rRNA en vertebrados. Durante la transcripción, el transcrito primario 45S se incorpora a un complejo 90S preribosómico nucleolar, en el que la maduración del rRNA y el ensamblaje del ribosoma están estrechamente acoplados. ① El precursor 45S se metila en más de 100 de sus 14.000 nucleótidos, tanto en las bases como en los grupos 2′-OH, algunas uridinas se conviertenen en pseudouridina, y también se producen unas pocas modificaciones de otro tipo. ② Una serie de cortes enzimáticos del precursor 45S producen los rRNA 18S, 5,8S y 28S, y las subunidades ribosómicas gradualmente toman forma con la incorporación de proteínas ribosómicas. Las reacciones de corte y todas las modificaciones requieren pequeños RNA nucleolares (snoRNA), que forman parte de complejos proteicos (snoRNP) del nucleolo que recuerdan los espliceosomas. El rRNA 5S se produce de forma independiente.

tipos de modificación) y las 78 proteínas ribosómicas. Los humanos tienen un número incluso mayor de nucleósidos modificados, unos 200, y un mayor número de snoRNA asociados. La composición de los complejos puede variar a medida que los ribosomas son ensamblados, y muchos de los complejos intermedios pueden rivalizar en complejidad con los propios ribosomas y snRNP. El rRNA 5S de la mayoría de eucariotas es sintetizado como un transcrito totalmente independiente por una polimerasa diferente (Pol III).

Las modificaciones más comunes de los nucleósidos en los rRNA eucarióticos son de nuevo la conversión de la uridina en pseudouridina y la metilación de los nucleósidos dependiente de adoMet (a menudo en los grupos 2′-hidroxilo). Estas reacciones son realizadas por complejos de proteínas y snoRNA, o **snoRNP,** formados por un snoRNA y cuatro o cinco proteínas, entre las que se encuentra el enzima que lleva a cabo la modificación. Hay dos clases de snoRNA, ambas definidas por elementos clave de secuencia conservados, representados por cajas simbolizadas por letras. La caja H/ACA de las snoRNP está implicada en la pseudouridililación, y la caja C/D de las snoRNP en las 2′-*O*-metilaciones. En contraste con las bacterias, el mismo enzima puede participar en la modificación de muchos sitios, guiado por los snoRNA.

Los snoRNA tienen de 60 a 300 nucleótidos de longitud. Muchos están codificados en los intrones de otros genes y son cotranscritos con estos genes. Cada snoRNA contiene una secuencia de 10 a 21 nucleótidos perfectamente complementaria de algún sitio de rRNA. Los elementos de secuencia conservados del resto del del snoRNA se pliegan en estructuras a las que se unen las proteínas de las snoRNP **(Fig. 26–26)**.

RNA de transferencia La mayoría de células tienen entre 40 y 50 tRNA diferentes y en las células eucarióticas hay múltiples copias de muchos de los genes de tRNA. Los RNA de transferencia proceden de precursores más largos por eliminación enzimática de nucleótidos de los extremos 5′ y 3′ **(Fig. 26–27)**. En los transcritos de tRNA de los eucariotas, ocasionalmente se encuentran intrones que deben ser eliminados. Cuando dos o más tRNA diferentes se encuentran en el mismo trascrito primario, son separados por corte enzimático. La endonucleasa RNasa P, presente en todos los organismos, elimina RNA del extremo 5′ de los tRNA. El enzima contiene proteína y RNA. El componente de RNA es esencial para la actividad y en las bacterias puede realizar su función con precisión aun en ausencia del componente proteico. La RNasa P es, por tanto, otro ejemplo de RNA catalítico, como se describe con mayor detalle más adelante. El extremo 3′ de los tRNA es modificado por una o más nucleasas, entre las que se encuentra la exonucleasa RNasa D.

Los precursores del RNA de transferencia pueden ser sometidos a una ulterior modificación postranscripción. El trinucleótido 3′-terminal CCA(3′), al que se unirá un aminoácido durante la síntesis proteica (Capítulo 27), no se encuentra en algunos precursores de tRNA bacterianos y en todos los eucarióticos y es añadido durante la maduración (Fig. 26–27). La adición corre a cargo de la tRNA nucleotidiltransferasa, enzima peculiar que une los tres ribonucleósidos trifosfato precursores en sitios activos separados y cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster para producir la secuencia CCA (3′). La creación de esta secuencia definida de nucleótidos es, por tanto, independiente de la presencia de

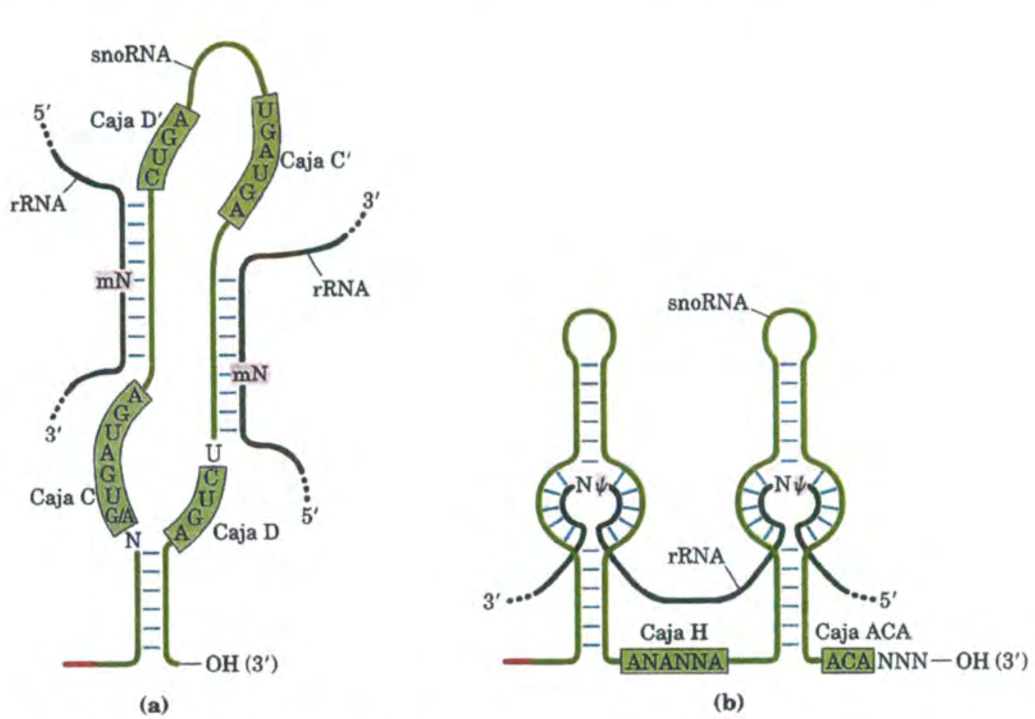


FIGURA 26–26 La función de los snoRNA como guía en la modificación del rRNA. **(a)** Apareamiento del RNA con la caja C/D de los snoRNA para guiar las reacciones de metilación. Los sitios de metilación en el rRNA diana (verde oscuro) se encuentran en las regiones apareadas con el snoRNA C/D. Las altamente conservadas secuencias de las cajas C y D (y C′ y D′) son sitios de unión de proteínas que forman parte de la gran snoRNP. **(b)** Apareamiento del RNA con la caja H/ACA de los snoRNA para guiar la pseudouridililación. Los sitios de conversión a pseudouridina en el rRNA diana (segmentos verdes) se encuentran de nuevo en regiones apareadas con el snoRNA, y las secuencias conservadas de las cajas H/ACA son sitios de unión de proteínas.

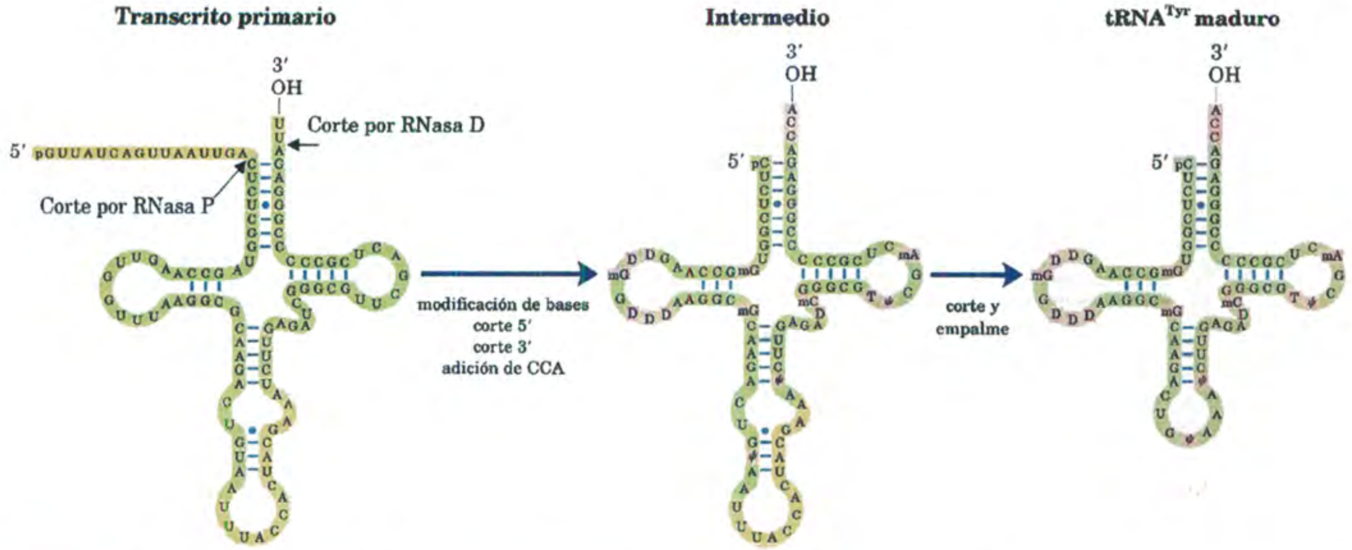


FIGURA 26–27 Maduración de los tRNA en bacterias y eucariotas. El $tRNA^{Tyr}$ (el tRNA específico para la unión de la tirosina; véase el Capítulo 27) de levadura se toma como ejemplo para ilustrar los pasos importantes. Las secuencias nucleotídicas mostradas en amarillo se eliminan del transcrito primario. Los extremos se modifican en primer lugar el 5′ y el 3′ después. A continuación se añade CCA al extremo 3′, un paso necesario en la maduración de los tRNA eucarióticos, así como en los tRNA bacterianos que carecen de esta secuencia en el transcrito primario. Mientras los extremos están siendo modificados, también se modifican bases específicas del resto del transcrito (véase la Fig. 26–23). La etapa final para los tRNA eucarióticos es el corte y empalme del intrón de 14 nucleótidos. Los intrones se encuentran en algunos tRNA eucarióticos, pero no en los tRNA bacterianos.

un molde de DNA o de RNA; el molde es el sitio de unión del enzima.

La etapa final de la maduración del tRNA consiste en la modificación de algunas bases por metilación, desaminación o reducción (Fig. 26–23). En el caso de la pseudouridina, la base (uracilo) es separada y vuelta a unir al azúcar en C-5. Algunas de estas bases modificadas se encuentran en posiciones características en todos los tRNA (Fig. 26–27).

Los RNA de función especializada experimentan varios tipos de modificación

El número de clases conocidas de RNA de función especializada aumenta rápidamente, así como la variedad de funciones que se han asociado con ellos. Muchos de estos RNA experimentan modificación.

Los snRNA y snoRNA no sólo facilitan las reacciones de modificación de RNA, sino que ellos mismos son sintetizados como precursores mayores y luego son modificados. Muchos snoRNA están codificados en los intrones de otros genes. A medida que los intrones son eliminados del pre-mRNA, las proteínas de los snoRNP se unen a las secuencias del snoRNA y las ribonucleasas eliminan el RNA sobrante en los extremos 5′ y 3′. Los snRNA destinados a los espliceosomas son sintetizados como pre-snRNA por la RNA polimerasa II, y las ribonucleasas eliminan el RNA sobrante de cada extremo. Determinados nucleósidos de los snRNA sufren 11 tipos de modificación, con predominio de la metilación en 2′-*O*- y la conversión de uridina en pseudouridina.

Los **micro RNA (miRNA)** son una clase especial de RNA implicada en la regulación génica. Son RNA no codificantes, de unos 22 nucleótidos de longitud, complementarios de la secuencia de regiones determinadas de los mRNA. Regulan la función del mRNA cortándolo o suprimiendo su traducción. Los miRNA se encuentran en los eucariotas multicelulares desde los gusanos y las moscas del vinagre a las plantas y los mamíferos. Hasta un 1% del genoma humano puede codificar miRNA, y los miRNA pueden estar implicados en la expresión de hasta un tercio de los mRNA humanos. Su función en la regulación génica se describe en el Capítulo 28.

Los miRNA se sintetizan a partir de precursores mucho mayores en varias etapas **(Fig. 26–28)**. Los transcritos primarios de los miRNA (pri-miRNA) varían mucho en tamaño; algunos están codificados por los intrones de otros genes y se coexpresan con estos genes huésped. Sus funciones en la regulación génica también se detallan en el Capítulo 28.

Algunas etapas del metabolismo de RNA están catalizadas por enzimas de RNA

El estudio de la modificación postranscripción de las moléculas de RNA llevó a uno de los descubrimientos más importantes de la bioquímica: la existencia de enzimas de RNA. Los ribozimas mejor caracterizados son los intrones de autocorte y empalme del grupo I, la RNasa P y el ribozima en cabeza de martillo (descrito más adelante). La mayoría de las actividades de estos ribozimas se basan en dos reacciones: la transesterificación (Fig. 26–14) y la hidrólisis del enlace fosfodiéster (corte). El sustrato de los ribozimas es a menudo una molécula de RNA, que incluso puede ser parte del propio ribozima. Con un sustrato de RNA, un catalizador de RNA puede aprovechar las interacciones de apareamiento de bases para alinear el sustrato.

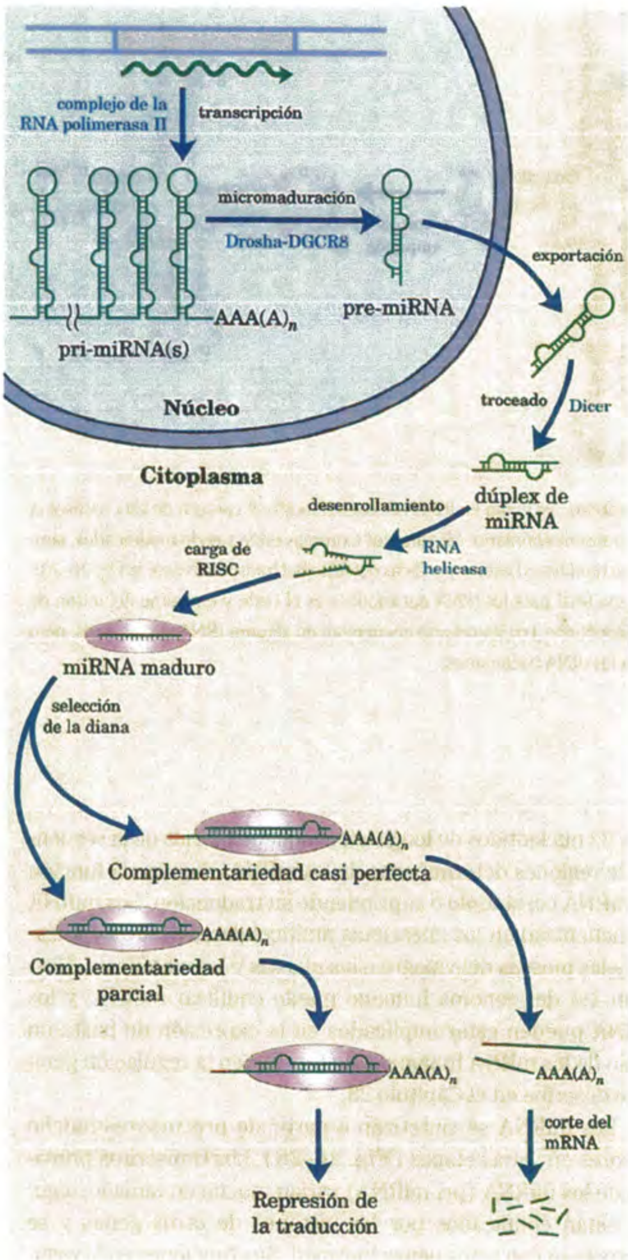


FIGURA 26–28 **Síntesis y maduración de los miRNA.** El transcrito primario de los miRNA es un RNA mayor de longitud variable, un pri-miRNA. Su maduración corre a cargo en gran parte de dos endorribonucleasas de la familia de la RNasa III, Drosha y Dicer. En primer lugar, en el núcleo, el pri-miRNA es reducido hasta un precursor de 70 a 80 nucleótidos (pre-miRNA) por un complejo proteico que contiene Drosha y otra proteína, DGCR8. El pre-miRNA es a continuación exportado al citoplasma, donde es modificado por Dicer para producir un miRNA casi maduro apareado con un corto complemento de RNA. El complemento es eliminado por una RNA helicasa y el miRNA maduro se incorpora a complejos proteicos, tales como el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), que a continuación se unen a un mRNA diana. Si la complementariedad entre el miRNA y su diana es casi perfecta, el mRNA diana es cortado. Si la complementaridad es sólo parcial el complejo bloquea la traducción del mRNA diana.

Los ribozimas tienen tamaños muy variables. Un intrón de autocorte y empalme del grupo I puede tener más de 400 nucleótidos. Un ribozima en cabeza de martillo consiste en dos cadenas de RNA con un total de sólo 41 nucleótidos (**Fig. 26–29**). Como sucede con los enzimas proteicos, la estructura tridimensional de los ribozimas es importante para la función. Los ribozimas se inactivan cuando se calientan por encima de su temperatura de fusión, al añadir agentes desnaturalizantes o al añadir oligonucleótidos complementarios, que destruyen los patrones normales de apareamiento de bases. Los ribozimas tam-

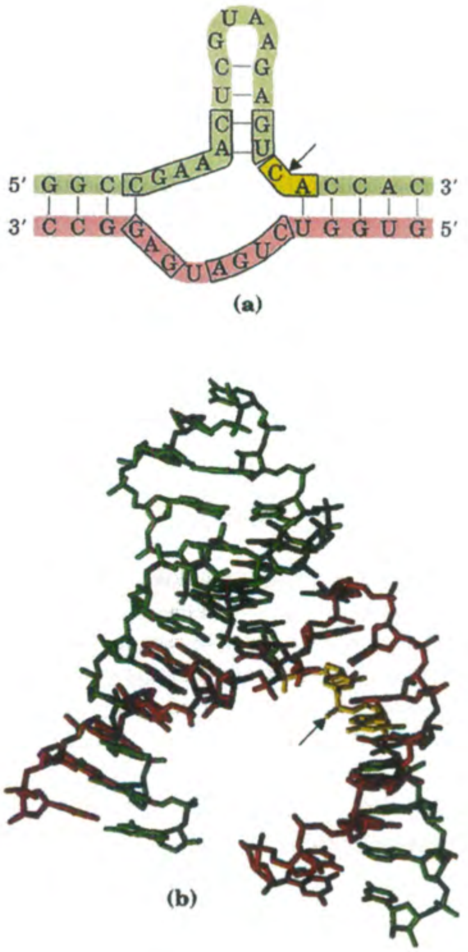


FIGURA 26–29 **Ribozima en cabeza de martillo.** Ciertas entidades de tipo viral denominadas virusoides tienen pequeños genomas de RNA y generalmente necesitan de otro virus que asista su replicación y/o su empaquetamiento. Algunos RNA de virusoides contienen pequeños segmentos que promueven reacciones de corte en sitios específicos que están asociadas con la replicación. Estos segmentos se denominan ribozimas en cabeza de martillo porque sus estructuras secundarias tienen forma de cabeza de martillo. Los ribozimas en cabeza de martillo han sido definidos y estudiados separadamente de los RNA virales mucho mayores. **(a)** Secuencias mínimas requeridas para la catálisis por el ribozima. Los nucleótidos encuadrados están muy conservados y son necesarios para la catálisis. La flecha indica el sitio de autocorte. **(b)** Estructura tridimensional (PDB ID 1MME; véase la Fig. 8–25b para una vista espacial). Las cadenas están coloreadas como en **(a)**. El ribozima en cabeza de martillo es un metaloenzima; los iones Mg^{2+} son necesarios para la actividad. El enlace fosfodiéster en el sitio de autocorte está indicado con una flecha. **Ribozima en cabeza de martillo**

bién pueden inactivarse mediante la sustitución de nucleótidos esenciales. La **Figura 26–30** muestra en detalle la estructura secundaria de un intrón de autocorte y empalme del grupo I del precursor del rRNA 26S de *Tetrahymena*.

Propiedades enzimáticas de los intrones del grupo I Los intrones de autocorte y empalme del grupo I comparten varias propiedades con los enzimas, entre las que se encuentran, además de acelerar considerablemente la velocidad de reacción, el comportamiento cinético y su especificidad. La fijación del cofactor guanosina (Fig. 26–14) a los intrones del grupo I de *Tetrahymena* (Fig. 26–30) es saturable ($K_m \approx 30\ \mu$M) y puede inhibirse competitivamente con 3′-desoxiguanosina. El intrón es muy preciso en la reacción de corte, debido en gran parte a una **secuencia guía interna,** capaz de aparearse con secuencias del exón próximas al sitio 5′ de corte y empalme (Fig. 26–30). Este apareamiento ayuda a alinear adecuadamente los enlaces que se han de cortar y juntar.

Debido a que el intrón es alterado químicamente durante la reacción de corte y empalme —sus extremos son cortados— podría parecer que carece de una propiedad enzimática clave: la capacidad para catalizar múltiples reacciones. Una examen más detallado muestra que después de la escisión, el intrón de 414 nucleótidos del rRNA de *Tetrahymena* puede actuar in vitro como un verdadero enzima (aunque in vivo es degradado rápidamente). Una serie de reacciones intramoleculares de ciclación y corte en el intrón escindido llevan a la pérdida de 19 nucleótidos de su extremo 5′. El RNA lineal restante de 395 nucleótidos, denominado L-19 IVS, promueve reacciones de transferencia de nucleotidilo, en las que algunos oligonucleótidos se alargan a expensas de otros **(Fig. 26–31)**. Los mejores sustratos son oligonucleótidos, tales como el oligómero sintético $(C)_5$, que se puedan aparear con la misma secuencia guía interna rica en guanilato que mantiene el exón 5′ en el lugar de autocorte y empalme.

La actividad enzimática del ribozima L-19 IVS resulta de un ciclo de reacciones de transesterificación mecánicamente similares a las de autocorte y empalme. Cada ribozima puede procesar unas 100 moléculas de sustrato por hora sin sufrir alteraciones; por tanto, el intrón actúa como un catalizador. Sigue la cinética de Michaelis-Menten, es específico para oligorribonucleótidos y puede ser inhibido competitivamente. La

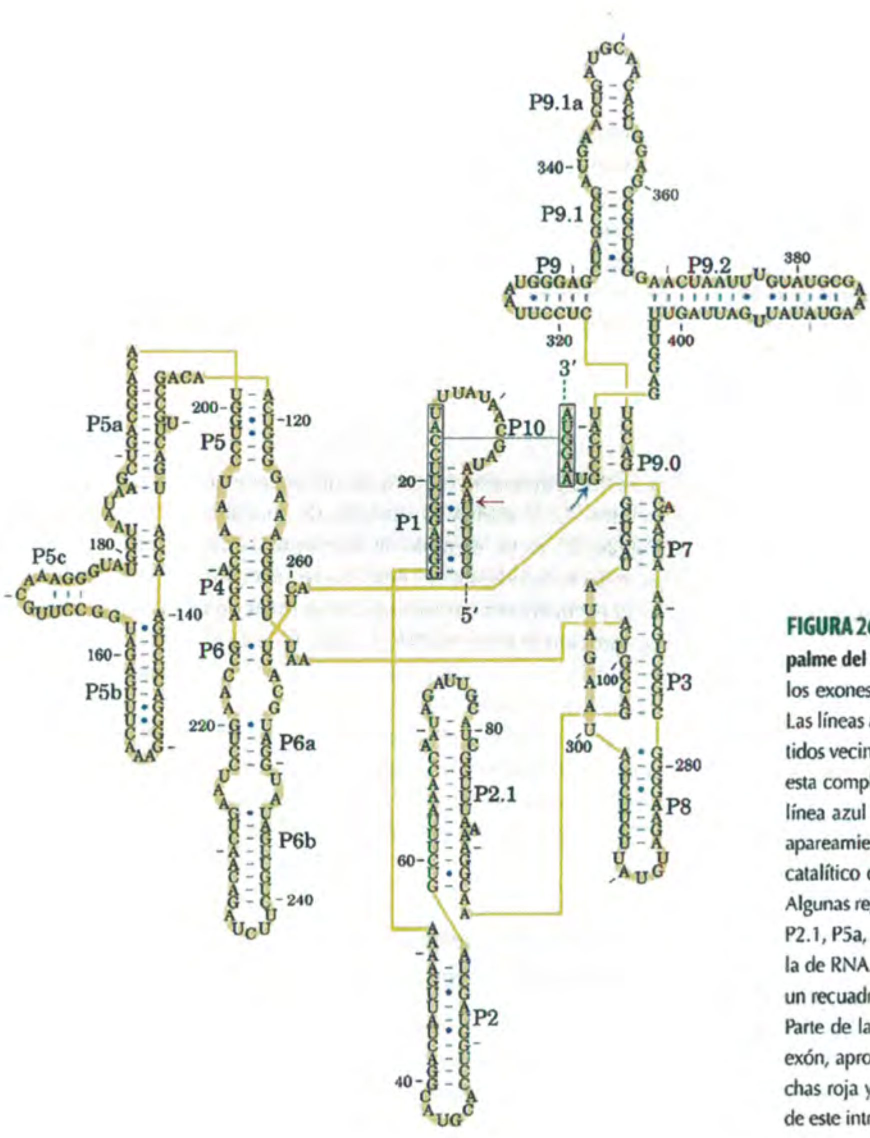


FIGURA 26–30 Estructura secundaria del intrón de autocorte y empalme del rRNA de *Tetrahymena*. Las secuencias de los intrones y de los exones están sombreadas en amarillo y verde, respectivamente. Las líneas amarillas gruesas representan los enlaces entre los nucleótidos vecinos en una secuencia continua (necesarias para representar esta compleja molécula en dos dimensiones; del mismo modo, una línea azul sobredimensionada entre unos residuos C y G indica un apareamiento normal); se muestran todos los nucleótidos. El núcleo catalítico de la actividad de autocorte y empalme está sombreado. Algunas regiones con apareamiento de bases están marcadas (P1, P3, P2.1, P5a, etc.) según una convención establecida para esta molécula de RNA. La región P1, que contiene la secuencia guía interna (en un recuadro), incluye el sitio de corte y empalme en 5′ (flecha roja). Parte de la secuencia guía interna se aparea con el extremo 3′ del exón, aproximando así los sitios de corte y empalme en 5′ y 3′ (flechas roja y azul). La estructura tridimensional de un gran segmento de este intrón se ilustra en la Figura 8–25c.

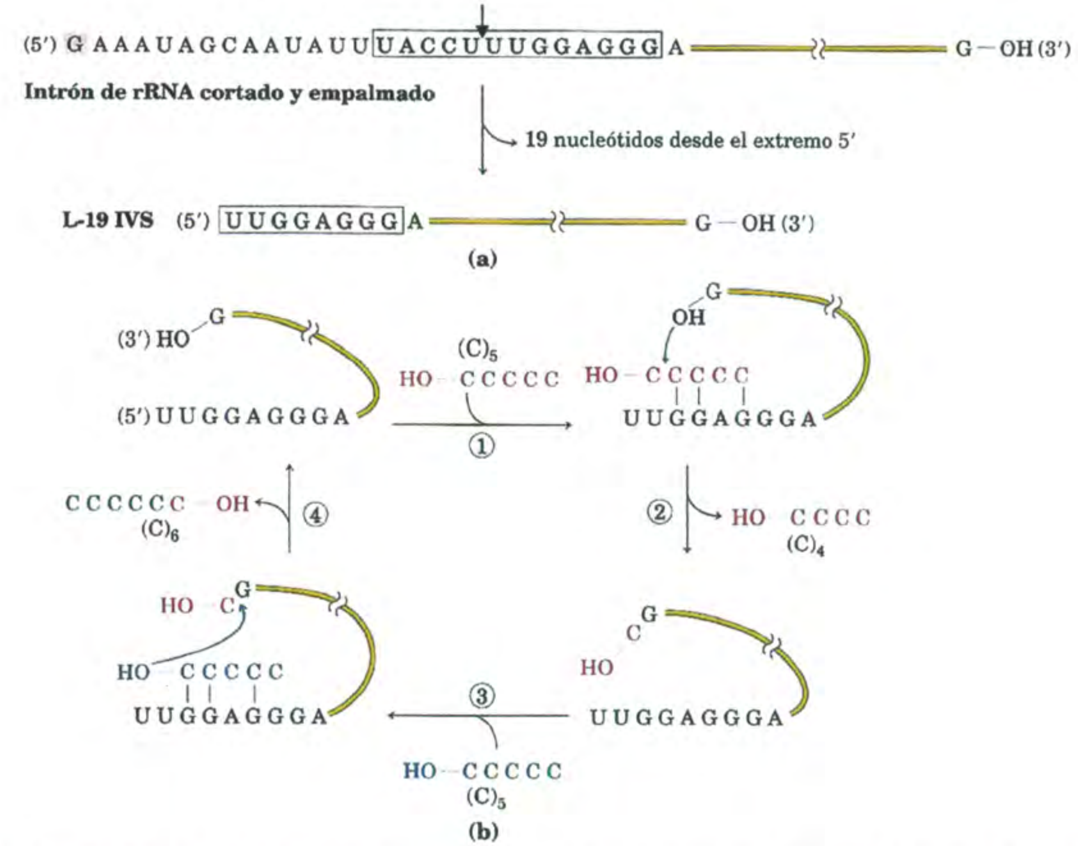


FIGURA 26–31 Actividad catalítica in vitro de L–19 IVS. (a) L-19 IVS se genera mediante la eliminación autocatalítica de 19 nucleótidos del extremo 5′ del intrón escindido de *Tetrahymena*. El sitio de corte está indicado por la flecha en la secuencia guía interna (en un recuadro). El residuo G (coloreado en rosa) añadido en la primera parte de la reacción de corte y empalme (véase la Fig. 26–15) forma parte de la secuencia eliminada. Una porción de la secuencia guía interna permanece en el extremo 5′ de L–19 IVS. **(b)** L-19 IVS alarga algunos oligonucleótidos de RNA a expensas de otros en un ciclo de reacciones de transesterificación (pasos de ① a ④). El 3′ OH del residuo G en el extremo 3′ de L-19 IVS juega un papel clave en este ciclo (observe que éste *no* es el residuo G añadido en la reacción de corte y empalme). $(C)_5$ es uno de los mejores sustratos del ribozima porque puede aparearse con la secuencia guía que permanece en el intrón. Aunque esta actividad catalítica es probablemente irrelevante para la célula, tiene implicaciones importantes para las hipótesis actuales sobre la evolución discutidas al final de este capítulo.

k_{cat}/K_m (la constante específica) es 10^3 M^{-1} s^{-1}, más baja que la de muchos enzimas; no obstante, este ribozima acelera la hidrólisis en un factor de 10^{10} en relación a la reacción sin catalizar. El ribozima utiliza la orientación del sustrato, la catálisis covalente y la catálisis de iones metálicos, estrategias empleadas por los enzimas proteicos.

Características de otros ribozimas La RNasa P de *E. coli* tiene tanto un componente de RNA (M1 RNA, 377 nucleótidos) como un componente proteico (M_r 17.500). En 1983, Sidney Altman y Norman Pace y colaboradores descubrieron que en ciertas condiciones el RNA M1 por sí solo era suficiente para la catálisis, pues cortaba los precursores de tRNA en la posición correcta.

El componente proteico sólo se necesita aparentemente para estabilizar el RNA o facilitar su función in vivo. El ribozima RNasa P reconoce la forma tridimensional del sustrato de pre-tRNA junto con la secuencia CCA y así puede cortar los extremos 5′ de diversos tRNA (Fig. 26–27).

El número de ribozimas catalíticos conocidos continúa expandiéndose. Algunos virusoides, pequeños RNA de virus vegetales, forman una estructura que promueve una reacción de autocorte. El ribozima en cabeza de martillo, ilustrado en la Fig. 26–29, es un ejemplo de este tipo. Cataliza la hidrólisis de un enlace fosfodiéster interno. La reacción de corte y empalme en el espliceosoma parece que tiene lugar en un centro catalítico formado por los snRNA, U2, U5 y U6 (Fig.26–17). Y lo más importante, un componente de RNA de los ribosomas cataliza la síntesis de proteínas (Capítulo 27).

El estudio del RNA catalítico ha permitido entender con mayor profundidad la catálisis en general y tiene importantes repercusiones en nuestra comprensión del origen y la evolución de la vida en nuestro planeta, un tema discutido en la Sección 26.3.

Los mRNA celulares se degradan a velocidades diferentes

La expresión de los genes está regulada a muchos niveles. Un factor crucial en la expresión génica es la concentración celular del correspondiente mRNA. La concentración de cualquier molécula depende de dos factores: su velocidad de síntesis y su ve-

locidad de degradación. Cuando la síntesis y la degradación de un mRNA están equilibradas, su concentración permanece en estado estacionario. Un cambio en las velocidades de síntesis o de degradación conduce a la acumulación o a la disminución del neta mRNA. Las vías de degradación garantizan que los mRNA no se acumulen en la célula y sean causa de la síntesis de proteínas innecesarias.

Las tasas de degradación de los mRNA de los diferentes genes eucarióticos varían ampliamente. Los productos génicos que sólo son necesarios durante un breve espacio de tiempo pueden tener mRNA con vidas medias del orden de minutos o incluso segundos. Los productos génicos que se necesitan constantemente por la célula pueden tener mRNA estables durante muchas generaciones celulares. La vida media promedio del mRNA en una célula de vertebrado es de unas 3 horas, con un recambio del contenido de cada tipo de mRNA de unas 10 veces por generación celular. La vida media de los mRNA bacterianos es mucho más corta, sólo unos 1,5 min, tal vez por exigencias de la regulación.

El RNA mensajero es degradado por ribonucleasas presentes en todas las células. En *Escherichia coli*, el proceso comienza con uno o unos pocos cortes por una endorribonucleasa, seguidos por degradación 3'→5' por exorribonucleasas. En los eucariotas inferiores la ruta principal consiste en primer lugar en el acortamiento de la cola de poli(A), seguida de la pérdida del casquete del extremo 5' y la degradación del mRNA en dirección 5'→3'. También existe una ruta de degradación en dirección 3'→5', que puede ser la ruta principal en los eucariotas superiores. Todos los eucariotas poseen un complejo de hasta 10 exorribonucleasas 3'→5' conservadas, denominado **exosoma,** que está implicado en la maduración del extremo 3' de los rRNA y tRNA y algunos RNA de función especializada (incluidos los snRNA y snoRNA), así como en la degradación de los mRNA.

Una estructura en horquilla presente en los mRNA bacterianos con un terminador independiente de ρ (Fig. 26–8) confiere estabilidad frente a la degradación. Estructuras en horquilla similares pueden estabilizar regiones seleccionadas de la estructura primaria de un transcrito y causar una degradación no uniforme de los transcritos. En las células eucarióticas, tanto la cola de poli(A) en 3' como el casquete en 5' son importantes para la estabilidad de muchos mRNA. **Ciclo vital de un mRNA**

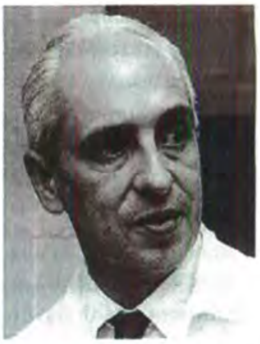
La polinucleótido fosforilasa forma polímeros de RNA de secuencia aleatoria

En 1955, Marianne Grunberg-Manago y Severo Ochoa descubrieron el enzima bacteriano **polinucleótido fosforilasa,** que in vitro cataliza la reacción

$$(\text{NMP})_n + \text{NDP} \rightleftharpoons \underset{\text{Polinucleótido alargado}}{(\text{NMP})_{n+1}} + \text{P}_i$$

La polinucleótido fosforilasa fue el primer enzima sintetizador de ácidos nucleicos descubierto (Arthur Kornberg descubrió la DNA polimerasa poco tiempo después). La reacción catalizada por la polinucleótido fosforilasa difiere fundamentalmente de las otras actividades polimerizantes discutidas hasta el momento por ser independiente de molde. El enzima utiliza los ribonucleósidos 5'-difosfato y no puede actuar sobre los 5'-trifosfato homólogos o sobre los desoxirribonucleósidos 5'-difosfato. El polímero de RNA formado por la polinucleótido fosforilasa contiene enlaces 3',5'-fosfodiéster normales, que pueden ser hidrolizados por la ribonucleasa. La reacción es fácilmente reversible y puede ser impulsada en la dirección de la degradación del polinucleótido incrementando la concentración de fosfato. La función probable de este enzima en la célula es la degradación de los mRNA hasta nucleósidos difosfato.

Marianne Grunberg-Manago



Severo Ochoa, 1905–1993

Debido a que la reacción de la polinucleótido fosforilasa no utiliza molde, no forma un polímero con una secuencia de bases específica. La reacción transcurre con idéntica facilidad con cualquiera de los cuatro nucleósidos difosfato y la composición de bases del polímero resultante refleja solamente las concentraciones relativas de los sustratos 5'-difosfato presentes en el medio.

La polinucleótido fosforilasa se puede utilizar en el laboratorio para la preparación de muchos tipos diferentes de polímeros de RNA con diferentes secuencias y frecuencias de bases. Los polímeros de RNA sintético con estas características hicieron posible deducir el código genético de los aminoácidos (Capítulo 27).

RESUMEN 26.2 Maduración del RNA

- Los mRNA eucarióticos se modifican por adición de un residuo de 7-metilguanosina en el extremo 5' y por corte y poliadenilación en el extremo 3' para formar una larga cola de poli(A).
- Muchos transcritos primarios de mRNA contienen intrones (regiones no codificantes), que son eliminadas por corte y empalme. La escisión de los intrones del grupo I presentes en algunos rRNA requiere guanosina como cofactor. Algunos intrones de los grupos I y II son capaces de autocorte y empalme; no se requieren enzimas proteicos. Los precursores del mRNA nuclear pertenecen a una tercera clase de intrones (la mayor), que son eliminados con ayuda de complejos RNA-proteína asociados en espliceosomas. Una cuarta clase de intrones, encontrada en algunos tRNA, es la única clase conocida que experimenta corte y empalme por enzimas proteicos.
- La función de muchos mRNA eucarióticos es regulada por micro RNA complementarios (miRNA). Los propios miRNA proceden de precursores mayores a través de una serie de reacciones de modificación.

- Los RNA ribosómicos y los RNA de transferencia provienen de precursores de mayor tamaño, que son cortados por nucleasas. Algunas bases se modifican enzimáticamente durante el proceso de maduración. Algunas modificaciones de los nucleósidos son guiadas por snoRNA, que forman parte de complejos proteicos denominados snoRNP.
- El autocorte y empalme de los intrones y del componente de RNA de la RNasa P (que corta el extremo 5′ de los precursores de tRNA) son dos ejemplos de ribozimas. Estos catalizadores biológicos tienen las propiedades de los auténticos enzimas. Generalmente promueven el corte hidrolítico y la transesterificación, utilizando RNA como sustrato. El intrón escindido del rRNA de *Tetrahymena*, perteneciente al grupo I, es capaz de facilitar combinaciones de estas reacciones, que resultan en un tipo de reacción de polimerización de RNA.
- La polinucleótido fosforilasa forma reversiblemente polímeros de RNA a partir de ribonucleósidos 5′-difosfato, añadiendo o eliminando ribonucleótidos del extremo 3′-hidroxilo del polímero. El enzima degrada el RNA in vivo.

26.3 Síntesis de RNA y de DNA dependiente de RNA

En nuestra discusión sobre la síntesis de DNA y de RNA hasta el momento, el papel de molde se ha reservado para el DNA. Sin embargo, algunos enzimas utilizan un molde de RNA para la síntesis de ácidos nucleicos.

Con la excepción muy importante de los virus con un genoma de RNA, estos enzimas juegan un papel modesto en las rutas de la información. Los virus de RNA han sido la fuente de la mayor parte de las polimerasas dependientes de RNA caracterizadas hasta el momento.

La existencia de la replicación del RNA requiere la modificación del dogma central (**Fig. 26–32**; compárese con el diagrama de la p. 945). Los enzimas que intervienen en la replicación del RNA tienen profundas implicaciones en la investigación de la naturaleza de las moléculas autorreplicativas que pueden haber existido en épocas prebióticas.

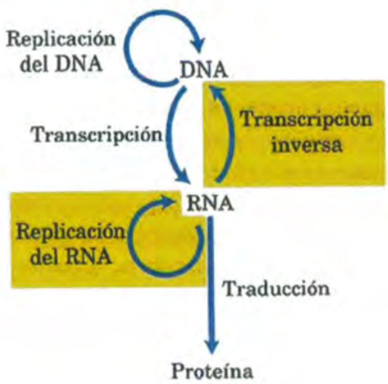


FIGURA 26–32 Ampliación del dogma central para incluir la síntesis de RNA y DNA dependiente de RNA.

La transcriptasa inversa produce DNA a partir de RNA vírico

Ciertos virus de RNA que infectan células animales contienen en el interior de la partícula vírica una DNA polimerasa dependiente de RNA denominada **transcriptasa inversa.** Durante la infección, el genoma de RNA monohebra (~10.000 nucleótidos) y el enzima penetran en la célula huésped. La transcriptasa inversa primero cataliza la síntesis de una cadena de DNA complementaria del RNA vírico (**Fig. 26–33**) y a continuación degrada la cadena de RNA del híbrido RNA-DNA y lo reemplaza con DNA. El DNA dúplex resultante a menudo queda incorporado en el genoma de la célula eucariótica huésped.

Estos genes víricos integrados (y en estado latente) pueden ser activados y transcritos y los productos génicos —proteínas víricas y el propio genoma vírico de RNA— son empaquetados como nuevos virus. Los virus de RNA que contienen transcriptasa inversa son conocidos como **retrovirus** (retro es el prefijo latino de "hacia atrás").

La existencia de transcriptasas inversas en virus de RNA fue predicha por Howard Temin en 1962, demostrándose finalmente la existencia de estos enzimas por el propio Temin e, independientemente, por David Baltimore en el año 1970. Su descubrimiento despertó una gran expectación, porque consti-

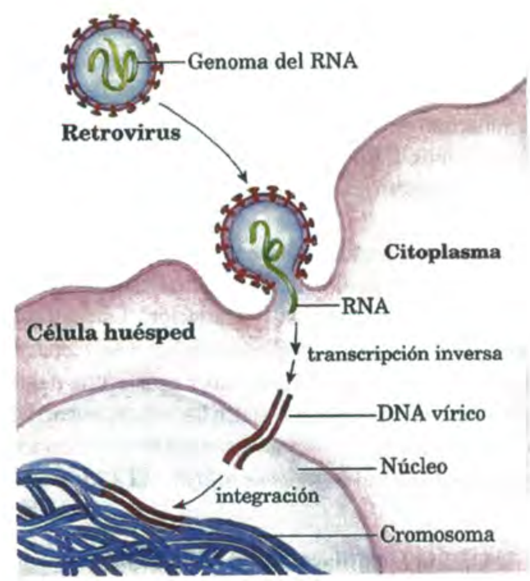


FIGURA 26–33 Infección retrovírica de una célula de mamífero e integración del retrovirus en el cromosoma del huésped. Las partículas víricas que penetran en la célula huésped contienen transcriptasa inversa vírica y un tRNA celular (captado de una célula huésped anterior) ya apareado con el RNA vírico. El tRNA facilita la inmediata conversión del RNA vírico en DNA de doble cadena por acción de la transcriptasa inversa, tal como se describe en el texto. Una vez convertido en DNA de doble cadena, el DNA entra en el núcleo y se integra en el genoma del huésped. La integración está catalizada por una integrasa codificada por el virus. La integración de DNA vírico en el DNA del huésped es mecánicamente similar a la inserción de transposones en los cromosomas bacterianos (véase la Fig. 25–45). Por ejemplo, se duplican unos cuantos pares de bases del DNA del huésped en el sitio de integración, formando repeticiones cortas de 4 a 6 pb en cada extremo del DNA retrovírico insertado (no mostrado).

Howard Temin, 1934–1994

David Baltimore

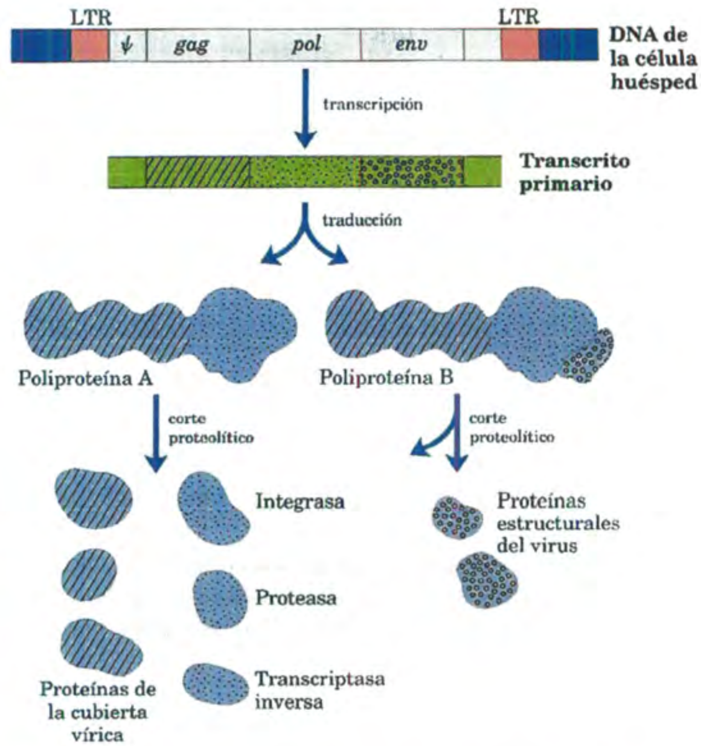


FIGURA 26–34 Estructura y productos génicos de un genoma integrado de un retrovirus. Las repeticiones terminales largas (LTR) tienen secuencias que son necesarias para la regulación y el inicio de la transcripción. La secuencia designada por ψ es necesaria para el empaquetamiento de los RNA retrovíricos en partículas víricas maduras. La transcripción del DNA retrovírico produce un transcrito primario que contiene los genes *gag*, *pol* y *env*. La traducción (Capítulo 27) produce una poliproteína, un único polipéptido largo producto de los genes *gag* y *pol* que es cortado en seis proteínas distintas. El corte y empalme del transcrito primario produce un mRNA derivado principalmente del gen *env*, que también es traducido como una poliproteína, que es cortada para generar las proteínas de la cubierta del virus.

tuía una prueba, en contra del dogma establecido, de que la información genética puede fluir "hacia atrás", es decir, del RNA al DNA.

Los retrovirus tienen típicamente tres genes: *gag* (que proviene de la designación histórica *g*roup *a*ssociated anti*g*en), *pol* y *env* **(Fig. 26–34)**. El transcrito que contiene *gag* y *pol* es traducido como una larga "poliproteína" que es cortada en seis proteínas con distintas funciones. Las proteínas derivadas del gen *gag* forman el núcleo interior de la partícula vírica.

El gen *pol* codifica la proteasa que corta el polipéptido largo, una integrasa que inserta el DNA vírico en los cromosomas del huésped y la transcriptasa inversa. Muchas transcriptasas inversas tienen dos subunidades, α y β. El gen *pol* codifica la subunidad β (M_r 90.000), mientras que la subunidad α (M_r 65.000) es simplemente un fragmento proteolítico de la subunidad β.

El gen *env* codifica las proteínas de la cubierta vírica. A cada extremo del genoma lineal de RNA se encuentran repeticiones terminales largas (LTR) de unos pocos centenares de nucleótidos. Una vez transcritas a DNA dúplex, estas secuencias facilitan la integración del cromosoma vírico en el DNA del huésped y contienen promotores que controlan la expresión génica del virus.

Las transcriptasas inversas catalizan tres reacciones diferentes: (1) síntesis de DNA dependiente de RNA, (2) degradación del RNA y (3) síntesis de DNA dependiente de DNA. Como muchas DNA y RNA polimerasas, las transcriptasas inversas contienen Zn^{2+}. Cada transcriptasa presenta la máxima actividad con el RNA de su propio virus, pero pueden usarse experimentalmente para producir DNA complementario de muchos RNA. Las actividades de síntesis de DNA y RNA y de degradación de RNA utilizan sitios activos separados en la proteína. La transcriptasa inversa requiere un cebador para iniciar la síntesis de DNA. El cebador es un tRNA transportado por la partícula vírica, obtenido durante una infección anterior. Este tRNA se aparea con una secuencia complementaria del extremo 3′ del RNA vírico. La nueva cadena de DNA se sintetiza en dirección $5' \rightarrow 3'$, como en todas las reacciones de las RNA y DNA polimerasas. Las transcriptasas inversas, lo mismo que las RNA polimerasas, carecen de actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ correctora de pruebas. Por lo general tienen una tasa de error de aproximadamente 1 por cada 20.000 nucleótidos añadidos. Una tasa de error tan alta es muy poco frecuente en la replicación del DNA y parece que constituye un rasgo característico de los enzimas que replican los genomas de RNA víricos. Ello resulta en una tasa más alta de mutación y en una velocidad de evolución vírica más elevada, que redunda en la aparición frecuente de nuevas cepas de retrovirus patógenos.

Las transcriptasas inversas se han convertido en reactivos importantes en el estudio de las relaciones DNA-RNA y en las técnicas de clonaje del DNA. Hacen posible la síntesis de un DNA complementario de un molde de mRNA. El DNA sintético preparado de esta manera, denominado **DNA complementario (cDNA)**, puede ser utilizado para clonar genes celulares (véase la Fig. 9–14).

Algunos retrovirus provocan cáncer y sida

Los retrovirus han desempeñado un papel destacado en el avance del conocimiento molecular sobre el cáncer. La mayoría de los retrovirus no matan a sus células huésped, sino que permanecen integrados en el DNA celular y se replican cuando la célula se divide. Algunos retrovirus, clasificados como virus tumorales de RNA, contienen un oncogén que puede provocar el crecimiento anormal de la célula. El primer virus de este tipo estudiado fue el virus del sarcoma de Rous (también

FIGURA 26–35 Genoma del virus del sarcoma de Rous. El gen *src* codifica una tirosina quinasa, perteneciente a una clase de enzimas que actúan en sistemas que intervienen en la división celular, en las interacciones intercelulares y en la comunicación intercelular (Capítulo 12). El mismo gen se encuentra en el DNA del pollo (el huésped usual de este virus) y en los genomas de muchos otros eucariotas, entre ellos el ser humano. Cuando se asocia con el virus del sarcoma de Rous, este oncogén se expresa a niveles anormalmente elevados, con lo que contribuye a la división celular no regulada y al cáncer.

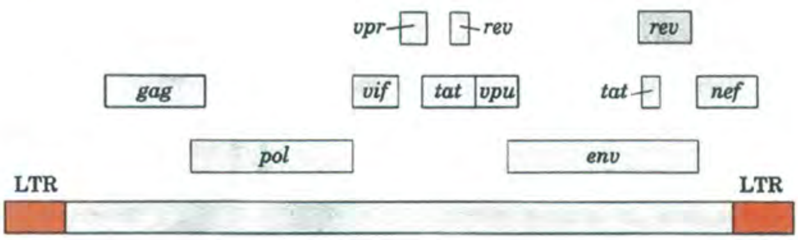


FIGURA 26–36 El genoma del VIH, el virus que provoca el sida. Además de los genes retrovíricos típicos, el VIH contiene varios genes pequeños que tienen diversas funciones (no identificadas aquí y no todas conocidas). Algunos de estos genes están solapados (p. 1072). Mecanismos de corte y empalme alternativos producen muchas proteínas diferentes a partir de este pequeño genoma ($9,7 \times 10^3$ nucleótidos).

denominado virus del sarcoma de las aves; **Fig. 26–35**), nombrado en consideración a F. Peyton Rous, quien estudió los tumores de los pollos, los cuales se sabe en la actualidad que están provocados por este virus. Desde el descubrimiento de los oncogenes por parte de Harold Varmus y Michael Bishop, se han descubierto muchos de estos tipos de genes en los retrovirus.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), es un retrovirus. Identificado en 1983, el VIH tiene un genoma de RNA con genes retrovíricos estándar junto con otros genes infrecuentes **(Fig. 26–36)**. A diferencia de muchos otros retrovirus, el VIH mata muchas de las células que infecta (principalmente linfocitos T), en lugar de causar la formación de tumores. Ello provoca la eliminación gradual del sistema inmune del organismo huésped. La transcriptasa inversa del VIH es incluso más propensa al error que otras transcriptasas inversas conocidas, aproximadamente unas diez veces más, hecho que explica las elevadas tasas de mutación de este virus. Cada vez que se replica el genoma vírico se producen uno o más errores, de modo que dos moléculas de RNA vírico son por lo general diferentes.

Muchas vacunas modernas para las infecciones víricas consisten en una o más proteínas de la cubierta, producidas por los métodos descritos en el Capítulo 9. Estas proteínas no son infecciosas por sí mismas pero estimulan el sistema inmune para reconocer y combatir las infecciones víricas posteriores (Capítulo 5). Debido a la elevada tasa de error de la transcriptasa inversa del VIH, el gen *env* de este virus (junto con el resto del genoma) muta muy rápidamente, lo que complica el desarrollo de una vacuna efectiva. Sin embargo, se necesitan ciclos repetidos de invasión celular y replicación para propagar la infección por el VIH, de modo que la inhibición de los enzimas víricos constituye la terapia más efectiva actualmente disponible. La proteasa del VIH es la diana de una clase de fármacos denominados inhibidores de la proteasa (véase el Recuadro 6–3). La transcriptasa inversa es blanco de otros fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de individuos infectados por VIH (Recuadro 26–2). ■

Muchos transposones, retrovirus e intrones pueden tener un origen evolutivo común

Algunos transposones eucarióticos de DNA bien caracterizados, de orígenes tan dispares como la levadura y la mosca del vinagre, tienen una estructura muy similar a la de los retrovirus, por lo que a veces se los denomina retrotransposones **(Fig. 26–37)**. Los retrotransposones codifican un enzima homólogo a la transcriptasa inversa retroviral y sus regiones codificantes están flanqueadas por secuencias LTR. Se transponen de una posición a otra del genoma celular por medio de un intermedio de RNA, probablemente utilizando la transcriptasa inversa para hacer una copia de DNA a partir del RNA, que acto seguido se integra en un nuevo sitio. La mayoría de transposones eucarióticos utilizan este mecanismo de transposición, mientras que los transposones bacterianos se trasladan en forma de DNA, directamente de una localización cromosómica a otra (véase la Fig. 25–45).

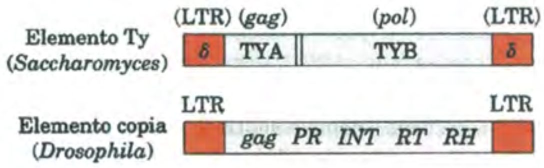
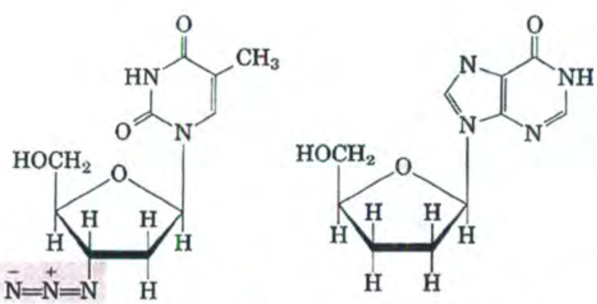


FIGURA 26–37 Transposones eucarióticos. El elemento Ty de la levadura *Saccharomyces* y el elemento copia de *Drosophila* (mosca del vinagre) son ejemplos de transposones eucarióticos, que tienen a menudo una estructura similar a los retrovirus, aunque carecen del gen *env*. Las secuencias δ del elemento Ty son funcionalmente equivalentes a los LTR retrovíricos. En el elemento copia, *INT* y *RT* son homólogos a los segmentos de la integrasa y de la transcriptasa inversa, respectivamente, del gen *pol*.

RECUADRO 26-2 MEDICINA Tratamiento del sida con inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH

La investigación de la química de la biosíntesis de ácidos nucleicos dependiente de molde, combinada con las modernas técnicas de la biología molecular, ha permitido conocer el ciclo vital y la estructura del virus de la inmunodeficiencia humana, el retrovirus que causa el sida. Pocos años después del aislamiento del VIH, estas investigaciones desembocaron en el desarrollo de fármacos capaces de alargar la vida de los individuos infectados por el VIH.

El primer fármaco en ser aprobado para uso clínico fue el AZT, un análogo estructural de la desoxitimidina. El AZT fue sintetizado por primera vez en 1964 por Jerome P. Horwitz. Fracasó como fármaco anticancerígeno (objetivo para el cual fue desarrollado), pero en 1985 se descubrió que era útil para el tratamiento del sida. El AZT es incorporado por los linfocitos T, células de sistema inmunitario particularmente vulnerables al



3′-Azido-2′,3′-didesoxitimidina (AZT) 2′,3′-Didesoxiinosina (DDI)

VIH, y convertido en AZT trifosfato. (El trifosfato no puede ser administrado directamente porque no puede atravesar la membrana plasmática.) La transcriptasa inversa del VIH tiene más afinidad por el AZT trifosfato que por el dTTP y la unión del AZT trifosfato al enzima inhibe competitivamente la unión de dTTP. Cuando el AZT es añadido al extremo 3′ de la cadena de DNA en crecimiento, la ausencia de un grupo 3′-hidroxilo provoca que la síntesis de la cadena de DNA termine prematuramente y la síntesis del DNA vírico cesa rápidamente.

El AZT trifosfato no es tóxico para los propios linfocitos T porque las DNA polimerasas *celulares* tienen menos afinidad por este compuesto que por el dTTP. A concentraciones de 1 a 5 μM, el AZT afecta a la transcripción inversa del VIH, pero no a la replicación del DNA celular. Lamentablemente, el AZT es tóxico para las células de la médula ósea, que son progenitoras de los eritrocitos, y los pacientes que toman AZT a menudo desarrollan anemia. El AZT puede aumentar la supervivencia de pacientes con sida avanzado en un año aproximadamente y retrasa la aparición de los síntomas del sida en los individuos que se encuentran en las primeras etapas de la infección por VIH. Algunos otros fármacos contra el sida, como la didesoxiinosina (DDI), tienen un mecanismo de acción similar. Fármacos más recientes se unen e interaccionan con la proteasa del VIH. Debido a la elevada tasa de error de la transcriptasa inversa del VIH y la rápida evolución resultante del VIH, los tratamientos eficaces contra las infecciones del VIH utilizan una combinación de fármacos dirigida a la vez contra la proteasa y la transcriptasa inversa.

Los retrotransposones carecen del gen *env* y por tanto no pueden formar partículas víricas. Se los puede considerar como virus defectuosos atrapados en las células. La comparación de los retrovirus y los transposones eucarióticos sugiere que la transcriptasa inversa es un enzima antiguo, anterior a la evolución de los organismos multicelulares.

Es interesante que muchos intrones del grupo I y del grupo II sean también elementos genéticos móviles. Además de sus actividades de autocorte y empalme, codifican endonucleasas de DNA que promueven su movimiento. Durante el intercambio genético entre células de la misma especie, o cuando DNA es introducido en una célula por parásitos o por otros medios, estas endonucleasas promueven la inserción del intrón en un sitio idéntico de otra copia de DNA de un gen homólogo que no contenga el intrón, en un proceso denominado **alojamiento** **(Fig. 26–38)**. Mientras que en los intrones del grupo I el alojamiento se basa en el DNA, en los intrones del grupo II el alojamiento tiene lugar a través de un intermedio de RNA. Las endonucleasas de los intrones del grupo II poseen actividad transcriptasa inversa asociada. Las proteínas pueden formar complejos con los propios intrones de RNA después de que los intrones hayan sido escindidos de los transcritos primarios. Puesto que el proceso de alojamiento implica la inserción del intrón de RNA en el DNA y la transcripción inversa del intrón, el movimiento de estos intrones ha sido denominado retroalojamiento.

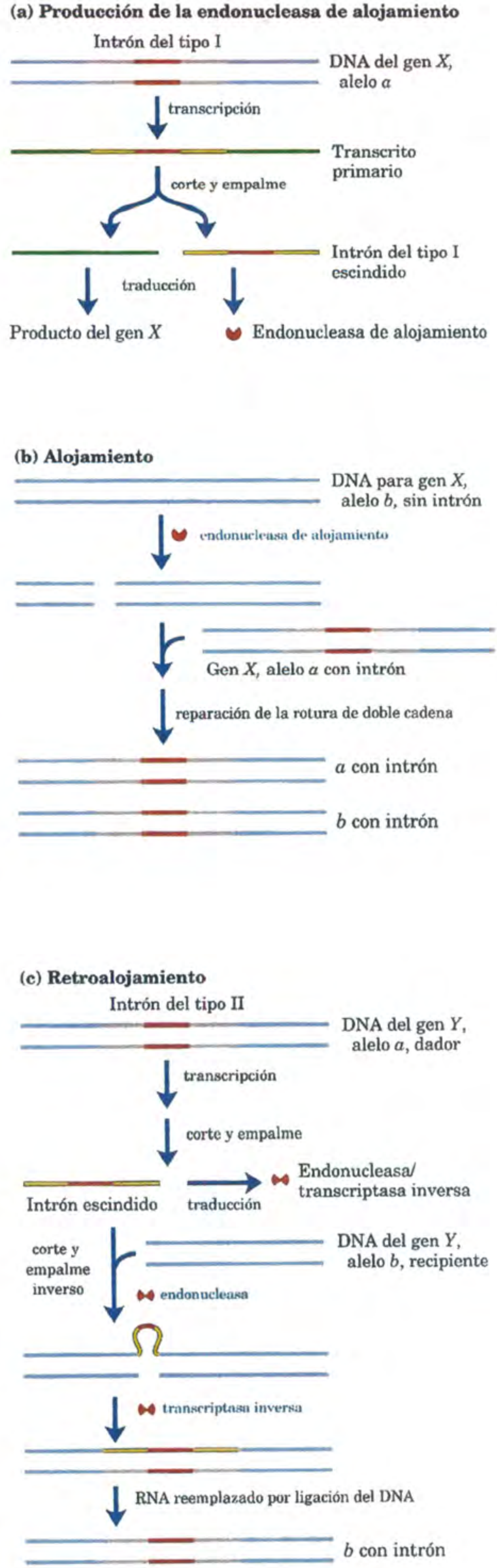
Con el tiempo, cada copia de un gen particular puede adquirir el intrón. Mucho más raramente, el intrón puede insertarse en una nueva localización en un gen no relacionado. Si ello no mata a la célula huésped, puede desembocar en la evolución y distribución de un intrón en una nueva localización. Las estructuras y mecanismos utilizados por los intrones móviles apoyan la idea de que al menos algunos intrones fueron en su origen parásitos moleculares, cuyo pasado evolutivo puede remontarse hasta los retrovirus y los transposones.

La telomerasa es una transcriptasa inversa especializada

Los telómeros son las estructuras especializadas que se encuentran en los extremos de los cromosomas eucarióticos lineales (véase la Fig. 24–9). Consisten generalmente en muchas copias en tándem de una corta secuencia oligonucleotídica, normalmente del tipo T_xG_y en una hebra y C_yA_x en la hebra complementaria, donde x e y se encuentran típicamente en el intervalo de 1 a 4 (p. 953). La longitud de los telómeros varía entre unas

FIGURA 26–38 Intrones que se mueven: alojamiento y retroalojamiento. Ciertos intrones incluyen un gen (mostrado en rojo) para enzimas que promueven el alojamiento (ciertos intrones de tipo I) o el retroalojamiento (ciertos intrones de tipo II). **(a)** El gen con el intrón escindido se une a un ribosoma y es traducido. Los intrones de alojamiento del tipo I codifican una endonucleasa específica de sitio, denominada endonucleasa de alojamiento. Los intrones de retroalojamiento del tipo II codifican una proteína con actividades a la vez de endonucleasa y de transcriptasa inversa.

(b) Alojamiento. El alelo *a* de un gen *X*, que contiene un intrón de alojamiento del tipo I, se encuentra en una célula que contiene el alelo *b* del mismo gen que carece del intrón. La endonucleasa de alojamiento producida por *a* corta *b* en la posición correspondiente al intrón de *a* y la reparación de rotura de cadena doble (recombinación con el alelo *a*; véase la Fig. 25–33) crea entonces una nueva copia del intrón en *b*. **(c)** Retroalojamiento. El *alelo a* de un gen *Y* contiene un intrón de retroalojamiento del tipo II; el alelo *b* carece de intrón. El intrón escindido se inserta en la hebra codificante de *b* en una reacción que es la inversa del corte y empalme que escindió el intrón del transcrito primario (véase la Fig. 26–16), excepto que en este caso la inserción es en el DNA en lugar del RNA. La hebra de DNA no codificante de *b* es cortada a continuación por la endonucleasa/transcriptasa inversa codificada por el intrón. Este mismo enzima utiliza el RNA insertado como molde para sintetizar una hebra de DNA complementaria. El RNA es degradado a continuación por ribonucleasas celulares y reemplazado por DNA.



pocas docenas de pares de bases en algunos protozoos ciliados hasta decenas de miles de pares de bases en los mamíferos. La hebra TG es más larga que la complementaria, de manera que queda una región de DNA de cadena sencilla de hasta unos pocos centenares de nucleótidos en el extremo 3′.

Los extremos de un cromosoma lineal no pueden ser replicados por las DNA polimerasas celulares. La replicación del DNA requiere un molde y un cebador, pero más allá del extremo de una molécula de DNA lineal no hay molde disponible para el apareamiento del cebador de RNA. Sin un mecanismo especial para replicar los extremos, los cromosomas se acortarían algo en cada generación celular. El problema lo soluciona un enzima denominado **telomerasa,** que incorpora telómeros a los extremos de los cromosomas.

Aunque la existencia de este enzima no sea sorprendente, su mecanismo de acción es destacable y no tiene precedentes. La telomerasa, lo mismo que otros enzimas descritos en este capítulo, contiene tanto RNA como proteína. El componente de RNA tiene una longitud de unos 150 nucleótidos y contiene alrededor de 1,5 copias de la repetición telomérica C_yA_x adecuada. Esta parte del RNA actúa de molde para la síntesis de la hebra T_xG_y del telómero. De este modo, la telomerasa actúa como una transcriptasa inversa celular que proporciona el sitio activo para la síntesis de DNA dependiente de RNA. A diferencia de las transcriptasas inversas de los retrovirus, la telomerasa copia sólo un pequeño segmento de RNA que lleva consigo. La síntesis del telómero requiere el extremo 3′ de un cromosoma como cebador y progresa en la dirección usual 5′→3′. Una vez sintetizada una copia de la repetición, el enzima se posiciona de nuevo para reemprender la extensión del telómero **(Fig. 26–39a)**.

Después de la extensión de la hebra T_xG_y por la telomerasa, la hebra complementaria C_yA_x es sintetizada por las DNA polimerasas celulares a partir de un cebador de RNA (véase la Fig. 25–13). La región de cadena sencilla está protegida por

(a)

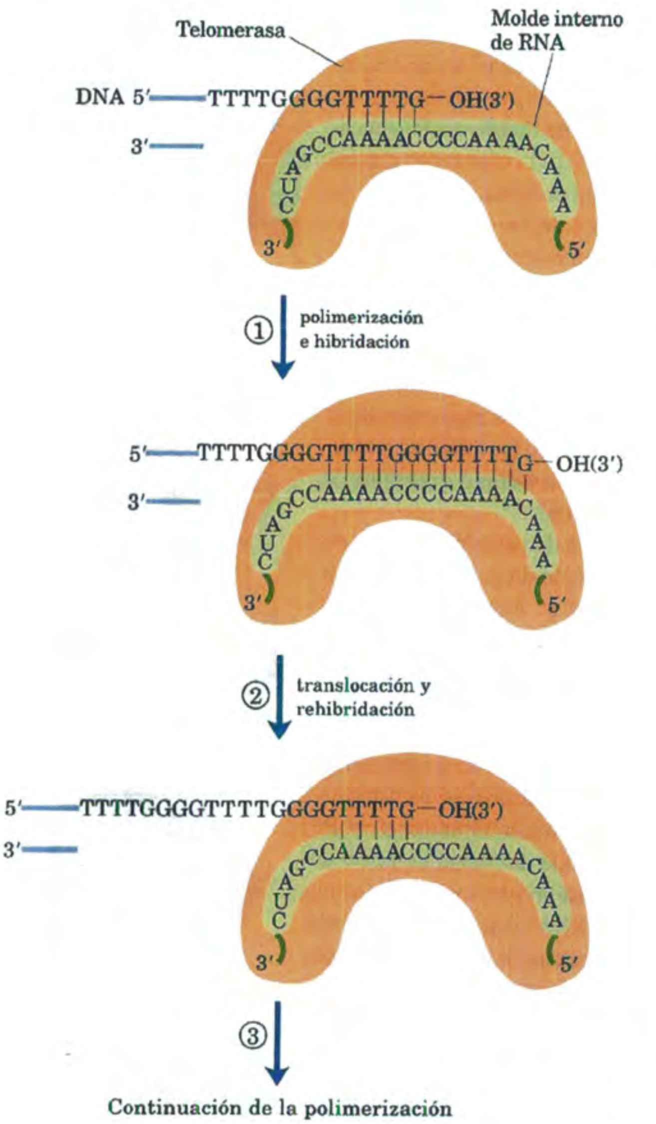
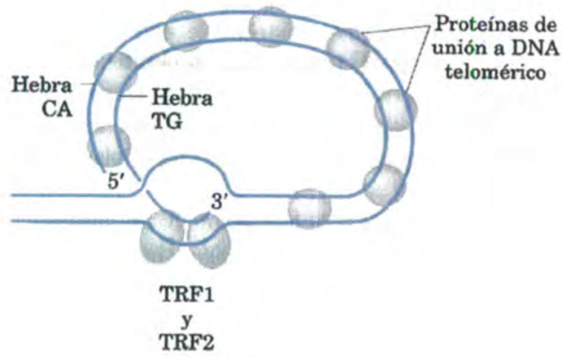


FIGURA 26–39 La hebra TG y el lazo T de los telómeros. El molde interno de RNA de la telomerasa se une y aparea con el cebador de TG (T_xG_y) del DNA. ① La telomerasa añade más residuos de T y G al cebador de TG y a continuación ② se desplaza para reposicionar el molde interno y permitir ③ la adición de más residuos de T y G. La hebra complementaria es sintetizada por DNA polimerasas celulares (no mostrado) **(b)** Estructura propuesta para los lazos T en los telómeros. La cola de cadena sencilla sintetizada por la telomerasa se pliega sobre sí misma y se aparea con su complementaria en la porción de doble cadena del telómero. Diversas proteínas de unión a telómeros, entre las que se encuentran TRF1 y TRF2 (factores de unión a repeticiones teloméricas), se unen al telómero. **(c)** Micrografía electrónica de un lazo T en el extremo de un cromosoma aislado de un hepatocito de ratón. La barra en la base de la micrografía representa una longitud de 5.000 pb.

(b)



(c)

proteínas de unión específicas en muchos eucariotas inferiores, especialmente en los que tienen telómeros con menos de unos pocos centenares de pares de bases. En los eucariotas superiores (incluidos los mamíferos), con telómeros con muchos miles de pares de bases, el extremo de cadena sencilla está secuestrado en una estructura especializada denominada **lazo T** (Fig. 26–39b). El extremo de cadena sencilla está plegado y apareado con su secuencia complementaria en la región de doble cadena del telómero. La formación del lazo T implica la invasión del DNA dúplex por el extremo 3′ de cadena sencilla del telómero, quizá mediante un mecanismo similar al del inicio de la recombinación genética homóloga (véase la Fig. 25–33). En los mamíferos, el DNA del lazo está unido a dos proteínas, TRF1 y TRF2, esta última implicada en la formación del lazo T. Los lazos T protegen los extremos 3′ de los cromosomas, haciéndolos inaccesibles a las nucleasas y a los enzimas que reparan roturas de doble cadena.

En los protozoos (tales como *Tetrahymena*) la pérdida de la actividad telomerasa da lugar a un acortamiento gradual de los telómeros con cada división celular, que acaba con la muerte de la línea celular. En el ser humano se ha observado una relación similar entre la longitud de los telómeros y el envejecimiento celular (cese de la división celular). En las células germinales, que contienen actividad telomerasa, se mantiene la longitud de los telómeros, pero no así en las células somáticas, que carecen de telomerasa. Existe una relación lineal inversa entre la longitud de los telómeros en fibroblastos cultivados y la edad del individuo del cual proceden: los telómeros de las células somáticas humanas se acortan gradualmente a medida que el individuo envejece. Si la actividad transcriptasa inversa de la telomerasa es introducida in vitro en las células somáticas humanas, la actividad telomerasa es restablecida y la esperanza de vida celular aumenta considerablemente.

¿El acortamiento gradual de los telómeros es clave en el proceso de envejecimiento? ¿La duración natural de nuestra vida está determinada por la longitud de los telómeros con que nacemos? La investigación en este campo podría proporcionar algunos descubrimientos fascinantes.

Algunos RNA víricos se replican por medio de una RNA polimerasa dependiente de RNA

Algunos bacteriófagos de *E. coli*, entre los que se encuentran f2, MS2, R17 y Qβ, así como algunos virus eucarióticos (como el virus de la gripe y el Sindbis, éste útimo asociado a una forma de encefalitis) tienen genomas de RNA. Los cromosomas de RNA monocatenario de estos virus, que también actúan como mRNA para la síntesis de las proteínas víricas, se replican en las células huésped por una **RNA polimerasa dependiente de RNA (RNA replicasa).** Todos los virus de RNA, a excepción de los retrovirus, tienen que codificar una proteína con actividad RNA polimerasa dependiente de RNA porque las células huésped no poseen este enzima.

La RNA replicasa de la mayoría de bacteriófagos de RNA tiene una masa molecular de ~210.000 y consta de cuatro subunidades. Una de estas subunidades (M_r 65.000), producto del gen de la replicasa, está codificada en el RNA vírico; esta subunidad contiene el sitio activo para la replicación. Las otras tres subunidades son proteínas del huésped que intervienen normalmente en la síntesis de proteínas del huésped: los factores de elongación Tu (M_r 45.000) y Ts (M_r 34.000) de *E. coli* (que normalmente incorporan los aminoacil-tRNA al ribosoma) y la proteína S1 (que es parte integrante de la subunidad ribosómica 30S). Estas tres proteínas del huésped pueden ayudar a la RNA replicasa a localizar y a fijarse a los extremos 3′ de los RNA víricos.

La RNA replicasa, aislada de células de *E. coli* infectadas con Qβ, cataliza la formación de un RNA complementario del RNA vírico, en una reacción equivalente a la catalizada por las RNA polimerasas dependientes de DNA. La síntesis de la nueva hebra de RNA se realiza en dirección 5′→3′, mediante un mecanismo químico idéntico al de otras reacciones de síntesis de ácidos nucleicos que requieren un molde. La RNA replicasa requiere RNA como molde y no funciona con DNA. El enzima carece de actividad endonucleasa correctora de pruebas y tiene una frecuencia de errores similar a la de la RNA polimerasa. A diferencia de las DNA y RNA polimerasas, las RNA replicasas son específicas para el RNA del propio virus; generalmente no se replican los RNA de la célula huésped. Ello explica porque se replican preferentemente los RNA víricos en la célula huésped, que contiene muchos otros tipos de RNA.

La síntesis de RNA ofrece pistas importantes sobre la evolución bioquímica

El orden y la complejidad extraordinarios que distinguen a los seres vivos de los sistemas inanimados son la manifestación de procesos vitales fundamentales. El mantenimiento de la vida requiere que se produzcan muy rápidamente numerosas transformaciones químicas *específicas*, sobre todo las que utilizan fuentes energéticas ambientales y las que sintetizan las macromoléculas complejas y especializadas que se encuentran en la célula. La vida depende de catalizadores poderosos y selectivos, los enzimas, y de sistemas de información capaces de almacenar las características de estos enzimas y de reproducirlas de generación en generación. Los cromosomas celulares no codifican las células, sino la estructura de los enzimas necesarios para construir y mantener la célula. Las preguntas paralelas acerca de la información y los catalizadores plantean el dilema clásico: ¿qué fue primero, la información necesaria para especificar la estructura o los enzimas necesarios para mantener y transmitir la información?

Carl Woese

Francis Crick, 1916–2004

Leslie Orgel

En la década de 1960, el descubrimiento de la complejidad estructural y funcional del RNA llevó a Carl Woese, Francis Crick y Leslie Orgel a proponer que esta macromolécula podría tener funciones tanto catalíticas como informativas. El descubrimiento de los RNA catalíticos transformó esta conjetura en hipótesis y ha fomentado la discusión en torno de la posible existencia de un "mundo de RNA" que habría facilitado la transición de la química prebiótica a la vida (véase la Fig. 1–34). El precursor de todas las formas de vida en este planeta, en el sentido de ser capaz de reproducirse a sí mismo a través de las generaciones, desde el origen de la vida hasta el presente, podría haber sido un RNA autorreplicativo o un polímero con características químicas similares.

¿Cómo podría haber surgido un polímero autorreplicativo? ¿Cómo podría haberse mantenido en un medio donde escaseaban los precursores para la síntesis de polímeros? ¿Cómo pudo avanzar la evolución desde un polímero con estas características hasta el mundo moderno de proteínas y DNA? Estas difíciles preguntas pueden ser afrontadas mediante la experimentación sobre cómo empezó y evolucionó la vida en nuestro planeta.

El origen probable de las bases púricas y pirimidínicas puede emanar de los experimentos encaminados a comprobar hipótesis sobre la química prebiótica (pp. 30–31). A partir de moléculas simples presentes probablemente en la atmósfera primigenia (CH_4, NH_3, H_2O, H_2), las descargas eléctricas de rayos y relámpagos generaron primero moléculas más reactivas tales como HCN y aldehídos y luego una serie de aminoácidos y ácidos orgánicos (véase la Fig. 1–33). Cuando moléculas tales como el HCN son abundantes, se sintetizan bases púricas y pirimidínicas en cantidades detectablas. Es destacable que una disolución concentrada de cianuro amónico sometida a reflujo

durante unos pocos días genera adenina con un rendimiento del 0,5% **(Fig. 26–40)**. La adenina probablemente haya sido el primero y más abundante constituyente nucleotídico en aparecer sobre la Tierra. Curiosamente, la mayoría de los cofactores enzimáticos contienen adenosina como parte de su estructura, a pesar de que la adenosina no juega un papel directo en la función del cofactor (véase la Fig. 8–38). Ello sugiere una relación evolutiva, basada en la sencilla síntesis de la adenina a partir del cianuro.

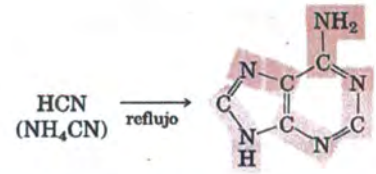


FIGURA 26–40 Posible síntesis prebiótica de adenina a partir de cianuro amónico. La adenina procede de cinco moléculas de cianuro, que se muestran coloreadas.

La hipótesis de un mundo de RNA requiere que un polímero de nucleótidos se reproduzca a sí mismo. ¿Puede un ribozima llevar a término su propia síntesis en un modo dependiente de molde? El intrón de autocorte y empalme del rRNA de *Tetrahymena* (Fig. 26–30) cataliza el ataque reversible de un residuo de guanosina sobre el punto de corte y empalme en 5′ **(Fig. 26–41)**. Si el sitio 5′ de corte y empalme y la secuencia que hace de guía interna son eliminados del intrón, el resto del intrón puede unir cadenas de RNA apareadas con oligonucleótidos cortos. Parte del intrón intacto restante actúa eficazmente de molde para el alineamiento y la ligación de los oligonucleóti-

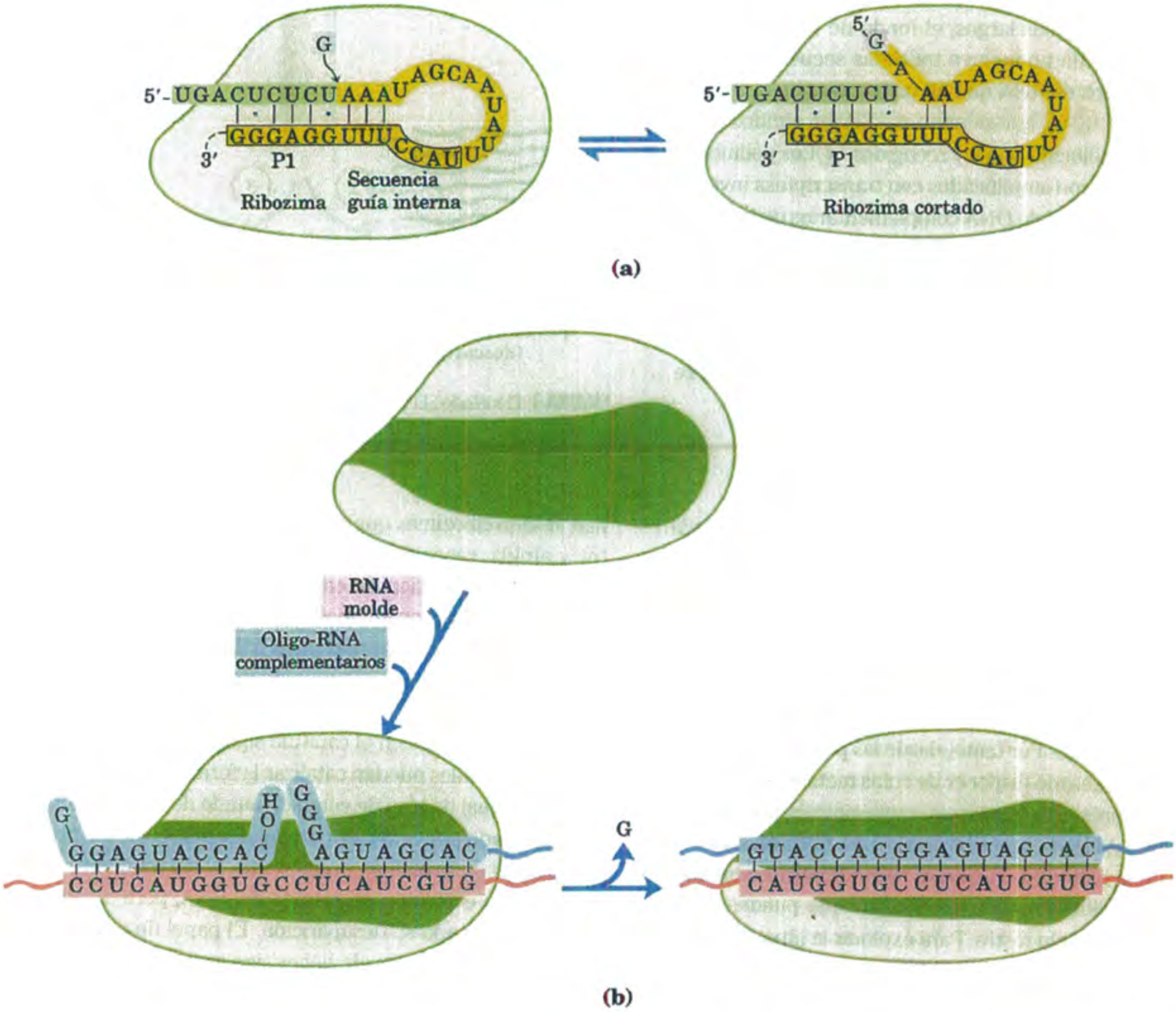


FIGURA 26–41 Síntesis dependiente de RNA de un polímero de RNA a partir de precursores oligonucleotídicos. **(a)** El primer paso en la eliminación del intrón de autocorte y empalme del grupo I del precursor del rRNA de *Tetrahymena* es un ataque reversible de un residuo guanosina sobre el sitio de escisión en 5′. Sólo se muestra en detalle P1, la región del ribozima que incluye la secuencia guía interna (en el recuadro) y el sitio de corte en 5′; el resto del ribozima se representa como un glóbulo verde. La estructura secundaria completa del ribozima se muestra en la Figura 26–30. **(b)** Si P1 es eliminada (mostrada como un "hueco" de color verde más oscuro), el ribozima conserva tanto su estructura tridimensional como su capacidad catalítica. Una nueva molécula de RNA añadida in vitro puede unirse al ribozima de la misma forma que la secuencia guía interna de P1 en **(a)**. De esta forma se dispone de un molde para continuar la polimerización del RNA cuando se aparean con él oligonucleótidos complementarios del RNA añadido. El ribozima puede unir estos oligonucleótidos en un proceso equivalente a la *inversión* de la reacción en **(a)**. Aunque en **(b)** sólo se muestra una de estas reacciones, la repetición de la unión y la catálisis puede resultar en la síntesis dependiente de RNA de largos polímeros de RNA.

RECUADRO 26–3 MÉTODOS El método SELEX para generar polímeros de RNA con nuevas funciones

El **SELEX** (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) se usa para generar **aptámeros,** oligonucleótidos seleccionados para que se unan fuertemente a una diana molecular. En general, el proceso está automatizado para hacer posible la rápida identificación de uno o más aptámeros con la especificidad de unión deseada.

La Figura 1 muestra cómo se usa el SELEX para seleccionar una especie de RNA que se une fuertemente al ATP. En el paso ①, una mezcla al azar de polímeros de RNA se somete a una "selección no natural", haciéndola pasar por una resina a la cual se ha unido ATP. El límite práctico de la complejidad de una mezcla de RNA en SELEX son 10^{15} secuencias diferentes, lo que permite promediar completamente 25 nucleótidos ($4^{25} = 10^{15}$). Para RNA más largos, el fondo de RNA utilizado para iniciar la búsqueda no incluye todas las secuencias posibles. ② Los polímeros de RNA que pasan a través de la columna son descartados; ③ los que se unen al ATP son eluídos de la columna con una disolución salina y recogidos. ④ Los polímeros de RNA recuperados son amplificados con transcriptasa inversa para hacer muchas copias de DNA complementarias de los RNA seleccionados; a continuación una RNA polimerasa hace muchas copias de RNA complementarias de las moléculas de DNA resultantes. ⑤ Este nuevo fondo de RNA es sometido al mismo procedimiento de selección y el ciclo es repetido una docena o más veces. Al final, sólo quedan unos pocos aptámeros, en este caso con una considerable afinidad por el ATP.

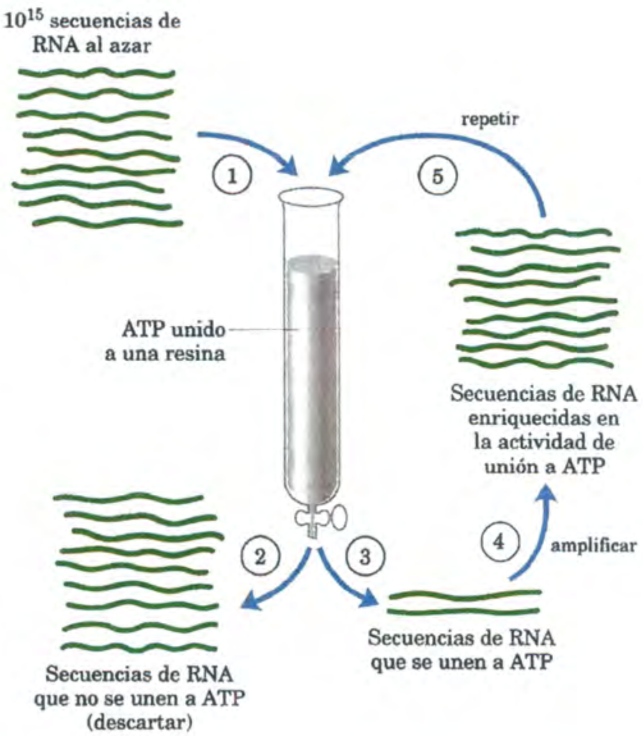


FIGURA 1 El método SELEX.

dos cortos. La reacción es en esencia la inversa del ataque de la guanosina sobre el punto de corte y empalme en 5′, pero el resultado es la síntesis de largos polímeros de RNA a partir de otros más cortos, con la secuencia del producto definida por un molde de RNA.

Un polímero autorreplicativo agotaría pronto las reservas de precursores suministrados por los relativamente lentos procesos de la química prebiótica. Por tanto, desde las primeras etapas de la evolución fue necesario disponer de rutas metabólicas que generaran precursores en abundancia, cuya síntesis presumiblemente estaba catalizada por ribozimas. Los ribozimas que se encuentran en la naturaleza disponen de un repertorio limitado de funciones catalíticas, y de los ribozimas que pueden haber existido no queda ningún rastro. Para explorar la hipótesis de un mundo de RNA con mayor profundidad es necesario saber si el RNA tiene el suficiente potencial para catalizar las muy diversas reacciones requeridas en un sistema primitivo de rutas metabólicas.

La búsqueda de RNA con nuevas funciones catalíticas se ha visto favorecida por un método que permite examinar mezclas de RNA de secuencia al azar y aislar aquellos que poseen ciertas actividades particulares. El SELEX consiste en un proceso de evolución acelerado en el tubo de ensayo (Recuadro 26–3). El SELEX ha sido utilizado para generar moléculas de RNA que se unen a aminoácidos, colorantes orgánicos, nucleótidos y cianocobalamina, entre otras moléculas. También se han aislado ribozimas que catalizan la formación de enlaces éster y amida, reacciones S_N2, adición de iones metálicos a las porfirinas y formación de enlaces carbono–carbono. La evolución de cofactores enzimáticos con "mangos" nucleotídicos que facilitan la unión a ribozimas pudo haber ampliado el repertorio de procesos químicos a disposición de los sistemas metabólicos primitivos.

Como veremos en el capítulo siguiente, algunas moléculas de RNA naturales pueden catalizar la formación de enlaces peptídicos, lo cual da idea de cómo el mundo de RNA ha podido ser transformado por el mayor potencial catalítico de las proteínas. La síntesis de proteínas pudo ser un acontecimiento trascendental en la evolución del mundo del RNA, pero también pudo haber precipitado su desaparición. El papel de portador de información del RNA puede haber sido asumido por el DNA porque el DNA es más estable químicamente. La RNA replicasa y la transcriptasa inversa pueden ser versiones modernas de enzimas que una vez jugaron un importante papel en la transición a los sistemas modernos basados en el DNA.

Los parásitos moleculares pueden también haberse originado en un mundo de RNA. Dada la ineficacia de los primeros sistemas autorreplicativos, la transposición puede haber sido una alternativa de la replicación como estrategia para reproducirse con éxito y sobrevivir. Los primitivos parásitos de RNA simplemente se introducirían en una molécula autorreplicativa mediante una transesterificación catalizada, para a continua-

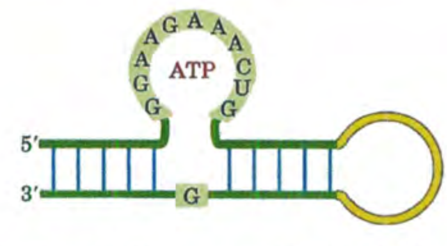


FIGURA 2 Aptámero de RNA que se une a ATP. Los nucleótidos sombreados son los necesarios para la actividad de unión.

En la Figura 2 se muestran las características críticas de un aptámero de RNA que se une al ATP; las moléculas que presenta esta estructura general se unen al ATP (y a otros nucleótidos de adenosina) con una $K_d < 50\ \mu M$. La Figura 3 muestra la estructura tridimensional de un aptámero de RNA de 36 nucleótidos (mostrado formando un complejo con AMP) generado por SELEX.

Este RNA posee la estructura mostrada en la Figura 2. Además de sus usos en la investigación de las potencialidades funcionales del RNA, el SELEX puede ser útil en la identificación de RNA cortos de utilidad farmacológica. Encontrar un aptámero que se una específicamente a todas las dianas terapéuticas potenciales puede ser imposible, pero la capacidad del SELEX para seleccionar y amplificar con rapidez una secuencia oligonucleotídica específica entre una compleja variedad de secuencias puede ser útil en el desarrollo de nuevas terapias. Por ejemplo, puede ser factible seleccionar un RNA que se una fuertemente a una proteína receptora de la membrana presente en determinadas células tumorales. El bloqueo de la actividad del receptor o el direccionamiento de una toxina hacia las células tumorales mediante su unión al aptámero mataría las células. El SELEX también se ha utilizado para seleccionar aptámeros de DNA que detectan esporas del ántrax. Muchas otras aplicaciones prometedoras se encuentran en curso de desarrollo. ■

FIGURA 3 (Adaptado de PDB ID 1RAW) Aptámero de RNA unido a AMP. Las bases de los nucleótidos conservados (que forman la cavidad de unión), en blanco; el AMP unido, en rojo.

ción ser replicados de forma pasiva. La selección natural habría convertido la transposición en específica de sitio, apuntando a secuencias que no interferirían con las actividades catalíticas del RNA huésped. Las secuencias autorreplicativas y los transposones de RNA pueden haber establecido una primitiva relación simbióntica, contribuyendo cada uno a la evolución del otro. Los modernos intrones, los retrovirus y los transposones podrían ser simplemente vestigios de la estrategia de hacerse transportar adoptada por los primitivos RNA parásitos. Estos elementos siguen contribuyendo considerablemente a la evolución de sus huéspedes.

Aunque el mundo de RNA sigue siendo una hipótesis con muchos aspectos todavía por explicar, las pruebas experimentales apoyan un número cada vez mayor de sus elementos fundamentales. Futuras investigaciones deberían ampliar nuestra compresión. Algunas piezas importantes del rompecabezas procederán de los estudios de la química fundamental de las células vivas y quizá de otros planetas. Mientras tanto el universo del RNA continua expandiéndose (Recuadro 26–4).

RESUMEN 26.3 Síntesis de RNA y de DNA dependiente de RNA

- Las DNA polimerasas dependientes de RNA, también denominadas transcriptasas inversas, fueron descubiertas en los retrovirus, que han de convertir sus genomas de RNA en DNA de doble cadena durante su ciclo vital. Estos enzimas transcriben el RNA vírico en DNA, proceso que puede aprovecharse de forma experimental para obtener DNA complementario.
- Muchos transposones eucarióticos están relacionadc con los retrovirus y su mecanismo de transposición incluye un intermedio de RNA.
- La telomerasa, el enzima que sintetiza los extremos teloméricos de los cromosomas lineales, es una transcriptasa inversa especializada que contiene un molde de RNA interno.
- Las RNA polimerasas dependientes de RNA, como las replicasas de los bacteriófagos de RNA, son específicas para un molde de RNA vírico.
- La existencia de RNA catalíticos y de rutas para la interconversión de RNA y DNA sugiere que una importante etapa de la evolución consistió en la aparición de un RNA (o un polímero equivalente) que pudo catalizar su propia replicación. El potencial bioquímico del RNA puede ser explorado por SELEX, un método para la rápida selección de secuencias de RNA con especiales propiedades catalíticas o de unión.

RECUADRO 26–4 Un universo de RNA en expansión lleno de RNA TUF

Las estimaciones actuales del número de genes en el genoma humano y en muchos otros genomas se mencionan en múltiples lugares de este texto. Estas estimaciones se basan en nuestra supuesta capacidad de reconocer un gen sobre la base de nuestros conocimientos del DNA, el RNA y las proteínas. ¿Es correcta esta suposición?

Como se ha mencionado en el Capítulo 9, menos del 2% del genoma humano codifica proteínas. Incluso cuando se consideran los intrones, hay que esperar que sólo una pequeña fracción del genoma se transcriba en RNA, principalmente mRNA, para codificar estas proteínas. El resto del genoma se ha denominado a veces DNA basura. El apelativo "basura" refleja simplemente nuestra ignorancia, que poco a poco deja paso a la concepción de que todo el genoma es plenamente funcional.

En un esfuerzo para definir mejor los límites del transcriptoma humano, se han desarrollado nuevas técnicas para determinar con mayor precisión qué secuencias genómicas se transcriben en RNA. Las respuestas son sorprendentes. Se transcribe mucho más de nuestro genoma que nadie hubiese podido suponer. Parece que en su mayor parte este RNA no codifica proteínas. En general está desprovisto de las estructuras (por ejemplo, la cola de poli(A) en 3′) que caracterizan el mRNA. ¿Para qué sirve, pues, este RNA?

La mayoría de métodos para afrontar este problema pertenecen a dos categorías: clonación de cDNA y microchips. La preparación de una genoteca de cDNA para estudiar los genes transcritos en un genoma eucariótico determinado se describe en el Capítulo 9 (véase la Fig. 9–14). Sin embargo, los métodos tradicionales para general cDNA a menudo sólo consiguen clonar una parte de la secuencia de un transcrito determinado. Sea porque la transcriptasa inversa se detenga en regiones del mRNA con estructura secundaria o bien simplemente se disocie, a menudo el 20% o menos de los clones de una genoteca de cDNA son DNA completos. Ello dificulta el uso de la genoteca para cartografiar los sitios de iniciación de la transcripción (TSS) y estudiar la parte del gen que codifica la secuencia amino-terminal de una proteína. Una de las muchas metodologías desarrolladas para resolver este problema se muestra en la Figura 1. Estas mejoras tecnológicas han permitido la preparación de genotecas de cDNA con mas del 95% de clones completos, lo que proporciona una fuente enriquecida de información sobre los RNA celulares. Sin embargo, los cDNA se preparan en general a partir de transcritos de RNA con colas de poli(A). El uso de microchips junto con los métodos de preparación de cDNA que no se basan en la presencia de colas de poliA (Fig. 2) ha mostrado que una buena parte del RNA de las células eucarióticas carece de las acostumbradas estructuras terminales.

El cuadro todavía no se ha completado, pero algunas conclusiones ya están claras. Si se excluyen las secuencias repetitivas (por ejemplo, transposones), que pueden llegar a repre-

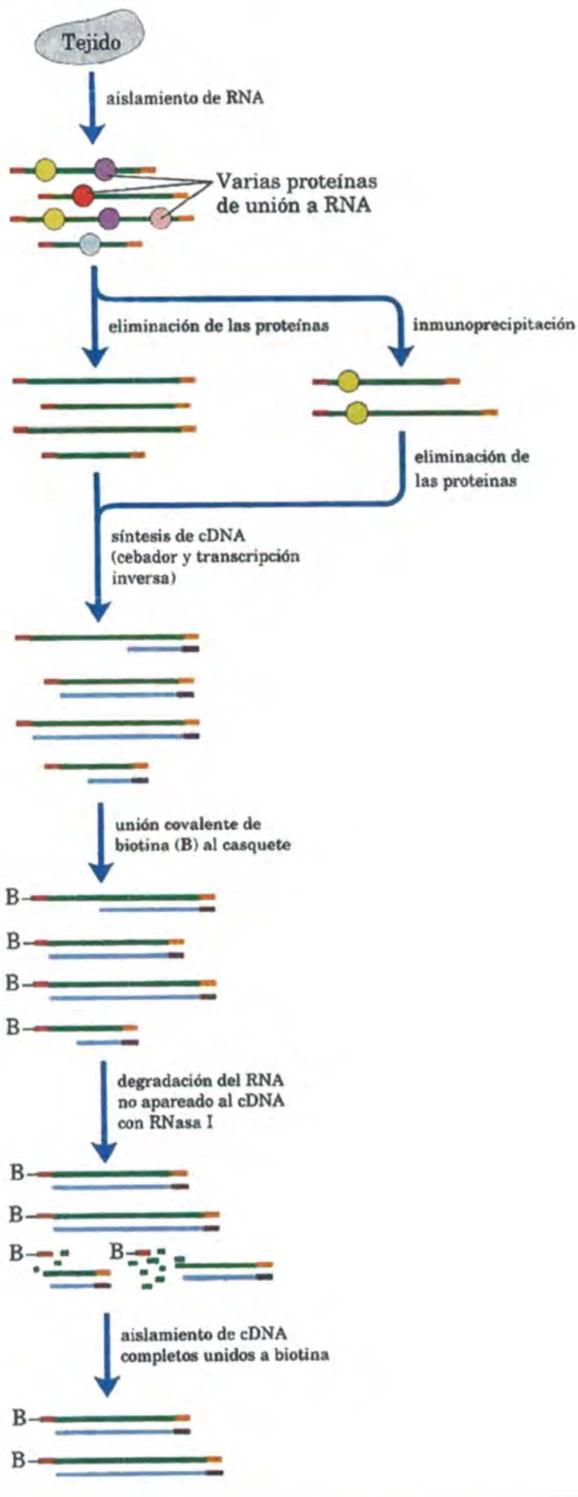


FIGURA 1 Una estrategia para clonar cDNA completos. Se aísla una mezcla de RNA de un tejido muestra. En algunos casos, los mRNA unidos a una determinada proteína pueden ser obtenidos por inmunoprecipitación de la proteína y aislamiento de los mRNA asociados. Se une biotina covalentemente a los extremos 5′ de los mRNA, aprovechando las características únicas del casquete en 5′. Se utiliza un cebador de poli(dT) para iniciar la transcripción inversa de los mRNA. La RNasa I degrada el RNA que no forma parte de un híbrido DNA-RNA y, por lo tanto, destruye parejas cDNA-RNA incompletas. Los híbridos cDNA-RNA completos se recuperan con bolitas recubiertas de estreptavidina (que se une a la biotina), se convierten en DNA dúplex y se clonan.

sentar la mitad del genoma de los mamíferos, al menos el 40% y tal vez la mayor parte del DNA genómico restante se transcribe en RNA. Parece haber más RNA que carecen de colas de poli(A) que con ellas. Buena parte de este RNA no es transportado hasta el citoplasma y permanece exclusivamente en el núcleo. Muchos segmentos del genoma se transcriben en ambas cadenas; un transcrito es complementario del otro, una relación denominada antisentido. Muchos de los RNA antisentido pueden estar implicados en la regulación de los RNA con los que se aparean. Muchos RNA se sintetizan en sólo uno o en pocos tejidos, y se descubren nuevos trasnscritos cada vez que se analiza un nuevo tejido. Por tanto, el transcriptoma completo no ha sido todavía definido para ningún organismo. Y lo que es más importante, muchos de estos nuevos RNA se transcriben a partir de segmentos genómicos, tales como los mostrados en la Figura 9–20, que comparten sintenia en más de un organismo. Esta conservación evolutiva sugiere que estos RNA desempeñan importantes funciones.

Algunos de los nuevos RNA son snoRNA, snRNA o miRNA, descubiertos en las últimas dos décadas. Se están descubriendo nuevas secuencias TSS y se están definiendo nuevas clases de moléculas de RNA. También se están describiendo nuevos patrones alternativos de corte y empalme. Todos estos descubrimientos están desafiando nuestras concepciones sobre los genes. En los genomas del ratón y del ser humano, incluso los familiares transcritos de mRNA que codifican proteínas pueden ser mucho más numerosos que los inicialmente aceptados, y el número de genes conocidos que codifican proteínas puede aumentar pronto. Sin embargo, la función de la mayoría de transcritos recientemente descubiertos es desconocida y simplemente se denominan TUF (transcritos de función desconocida). Este nuevo universo de RNA representa una frontera que promete nuevos avances en el conocimiento del funcionamiento de las células eucarióticas y tal vez una nueva visión de nuestros orígenes en un remoto mundo de RNA.

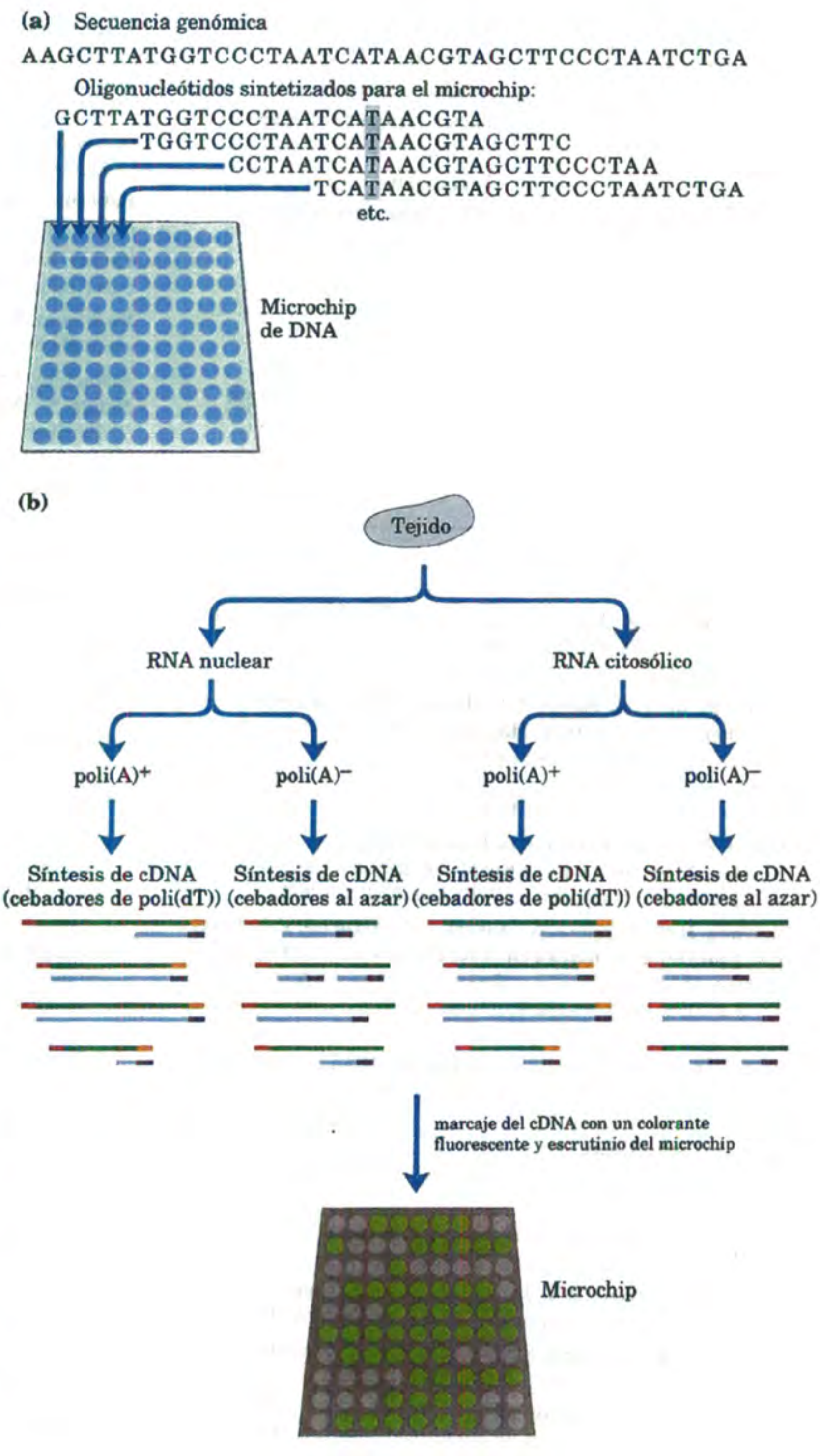


FIGURA 2 Definición del transcriptoma mediante microchips. **(a)** Se sintetizan microchips solapados, que representen la parte no repetitiva del genoma. En un chip solapado, los oligonucleótidos sucesivos en los puntos individuales tienen secuencias solapadas, de manera que cada nucleótido (como la T mostrada en azul) está representado múltiples veces. **(b)** Se fracciona una muestra de tejido para obtener muestras nucleares y citoplasmáticas, y se aísla RNA de ambas. El RNA con colas de poli(A) se separa del RNA sin colas (pasando el RNA por una columna con poli(dT) unido). El RNA con colas de poli(A) se convierte en cDNA mediante los métodos descritos en la Figura 1. El RNA carente de cola de poli(A) se convierte en cDNA utilizando cebadores con secuencias aleatorias. Los fragmentos de DNA resultantes no tienen exactamente la misma longitud que el RNA del que se derivan, pero el conjunto de moléculas de DNA contiene la mayoría de secuencias presentes en los RNA originales. A continuación se marcan las muestras de cDNA y se usan en el escrutinio de los microchips. Las señales de los microchips indican las secuencias que fueron transcritas en RNA.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

Bibliografía

General

Jacob, F. & Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318–356.

Artículo clásico que introdujo muchas ideas importantes.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., & Matsudaira, P. (2008) *Molecular Cell Biology*, 6th edn, W. H. Freeman & Company, New York.

Síntesis de RNA dirigida por DNA

Boeger, H., Bushnell, D., Davis, R., Griesenbeck, J., Lorch, Y., Strattan, J., Westover, K., & Kornberg, R. (2005) Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Lett.* **579**, 899–903.

Bourbon, H.M., Aguilera, A., Ansari, A.Z., Asturias, F.J., Berk, A.J., Bjorklund, S., Blackwell, T.K., Borggrefe, T., Carey, M., Carlson, M., et al. (2004) A unified nomenclature for protein subunits of Mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol. Cell* **14**, 553–557.

DeHaseth, P.L., Zupancic, M.L., & Record, M.T., Jr. (1998) RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **180**, 3019–3025.

Gruber, T.M. & Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 441–466.

Laine, J.P. & Egly, J.M. (2006) When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet.* **22**, 430–436.

Mooney, R.A., Darst, S.A., & Landick, R. (2005) Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell* **20**, 335–345.

Murakami, K.S. & Darst, S.A. (2003) Bacterial RNA polymerases: the wholo story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 31–39.

Svejstrup, J.Q., Conaway, R.C., & Conaway, J.W. (2006) RNA polymerase II: a "Nobel" enzyme demystified. *Mol. Cell* **24**, 637–642.

Thomas, M.C. & Chiang, C.M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105–178.

Maduración del RNA

Blencowe, B.J. (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**, 37–47.

Butcher, S.E. & Brow, D.A. (2005) Towards understanding the catalytic core structure of the spliceosome. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 447–449.

Decatur, W.A. & Fournier, M.J. (2003) RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J. Biol. Chem.* **278**, 695–698.

Gogarten, J.P. & Hilario, E. (2006) Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC Evol. Biol.* **6**, 94.

Granneman, S. & Baserga, S.J. (2005) Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly, and pre-rRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 281–286.

Huang, Y.Q. & Steitz, J.A. (2005) SRprises along a messenger's journey. *Mol. Cell* **17**, 613-615.

Kaberdin, V.R. & Blasi, U. (2006) Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 967–979.

Parker, R. & Song, H.W. (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 121–127.

Rodriguez-Trelles, F., Tarrio, R., & Ayala, F.J. (2006) Origins and evolution of spliceosomal introns. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 47–76.

Schneider, D.A., Michel, A., Sikes, M.L., Vu, L., Dodd, J.A., Salgia, S., Osheim, Y.S., Beyer, A.L., & Nomura, M. (2007) Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol. Cell* **26**, 217–229.

Wienholds, E. & Plasterk, R.H.A. (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* **579**, 5911–5922.

Síntesis de RNA o de DNA dependiente de RNA

Blackburn, E.H., Greider, C.W., & Szostak, J.W. (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nat. Med.* **12**, 1133–1138.

Boeke, J.D. & Devine, S.E. (1998) Yeast retrotransposons: finding a nice, quiet neighborhood. *Cell* **93**, 1087–1089.

Cech, T.R. (2004) Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* **116**, 273–279.

Frankel, A.D. & Young, J.A.T. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 1–25.

Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., & de Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503–514.

Temin, H.M. (1976) The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis. *Science* **192**, 1075–1080.

Discusión de la propuesta original sobre la transcripción inversa en los retrovirus.

Ribozimas y evolución

Carninci, P. (2007) Constructing the landscape of the mammalian genome. *J. Exp. Biol.* **210**, 1497–1506.

Un buen resumen de los resultados que muestran que el transcriptoma de los mamíferos es más extenso de lo que se creía anteriormente.

DeRose, V.J. (2002) Two decades of RNA catalysis. *Chem. Biol.* **9**, 961–969.

Doudna, J.A. & Lorsch, J.R. (2005) Ribozyme catalysis: not different, just worse *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 395–402.

Green, R. & Doudna, J.A. (2006) RNAs regulate biology. *ACS Chem. Biol.* **1**, 335–338.

Huttenhofer, A. & Vogel, J. (2006) Experimental approaches to identify non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **34**, 635–646.

Joyce, G.F. (2002) The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **418**, 214–221.

Kazantsev, A.V. & Pace, N.R. (2006) Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 729–740.

Müller, U.F. (2006) Re-creating an RNA world. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1278–1293.

Narlikar, G.J. & Herschlag, D. (1997) Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 19–59.

Willingham, A.T. & Gingeras, T.R. (2006) TUF love for "junk" DNA. *Cell* **125**, 1215–1220.

Yarus, M. (2002) Primordial genetics: phenotype of the ribocyte. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 125–151.

Especulación acerca de cómo pudo haber sido la vida basada en el RNA y un buen resumen de las investigaciones relacionadas con esta hipótesis.

Problemas

1. RNA polimerasa (a) ¿Cuánto tardaría la RNA polimerasa de *E. coli* en sintetizar el transcrito primario de los genes de *E. coli* que codifican los enzimas del metabolismo de la lactosa (el operón *lac* de 5.300 pb discutido en el Capítulo 28)? (b) ¿Qué distancia habrá recorrido la "burbuja" formada por la RNA polimerasa en 10 segundos?

2. Corrección de errores por las RNA polimerasas Las DNA polimerasas pueden corregir errores, mientras que la capacidad de corrección de errores de las RNA polimerasas es bastante limitada. Dado que un error de una sola base, tanto en la replicación como en la transcripción, puede conducir a un error en la síntesis de proteínas, sugiera una posible explicación biológica de esta diferencia.

3. Maduración postranscripción del RNA Prevea los probables efectos de una mutación en la secuencia (5′)AAUAAA en un transcrito de RNA eucariótico..

4. Hebras codificantes y hebras molde El genoma de RNA del fago Qβ es la hebra que no sirve de molde, o hebra codificante, y que al introducirse en la célula actúa como un mRNA. Suponga que la RNA replicasa del fago Qβ haya sintetizado principalmente las hebras molde de RNA y que las haya incorporado a las partículas víricas en lugar de las hebras no molde. ¿Cuál sería el destino de las hebras molde al entrar en una nueva célula? ¿Qué enzima habría que incluir en estas partículas víricas para invadir con éxito una célula huésped?

5. Química de la biosíntesis de los ácidos nucleicos Describa tres propiedades comunes a las reacciones catalizadas por la DNA polimerasa, la RNA polimerasa, la transcriptasa inversa y la RNA replicasa. ¿En qué se parece y en qué se diferencia la polinucleótido fosforilasa de estos enzimas?

6. Corte y empalme de RNA ¿Cuál es el número mínimo de reacciones de transesterificación necesario para cortar y empalmar un intrón en un transcrito de mRNA? ¿Por qué?

7. Maduración del RNA Si se bloquea el corte y empalme de un mRNA de una célula de un vertebrado, las reacciones de modificación del rRNA también se bloquean. Sugiera una explicación.

8. Genomas de RNA Los virus de RNA tienen genomas relativamente pequeños. Por ejemplo, los RNA monohebra de los retrovirus tienen unos 10.000 nucleótidos y el RNA de Qβ sólo tiene 4.220 nucleótidos. Dadas las propiedades de la transcriptasa inversa y de la RNA replicasa descritas en este capítulo, ¿puede sugerir una razón para que estos genomas víricos sean tan pequeños?

9. Escrutinio de RNA por SELEX El límite práctico para el número de secuencias de RNA diferentes que pueden ser examinadas en un experimento de SELEX es 10^{15}. (a) Suponga que trabaja con oligonucleótidos de 32 nucleótidos de longitud, ¿Cuántas secuencias hay en una muestra que contenga todas las secuencias posibles? (b) ¿Qué porcentaje puede ser examinado en un experimento de SELEX? (c) Suponga que quiere seleccionar una molécula de RNA que catalice la hidrólisis de un éster en particular. Apoyándose en sus conocimientos de la catálisis, proponga una estrategia de SELEX que permita seleccionar el catalizador apropiado.

10. Muerte lenta La seta mortal *Amanita phalloides* contiene varias sustancias peligrosas, entre las que se encuentra la α-amanitina, que es mortal. Esta toxina bloquea la elongación del RNA en los consumidores del hongo, uniéndose a la RNA polimerasa II con gran afinidad; es mortal a concentraciones de 10^{-8} M. La reacción inicial a la ingestión del hongo son trastornos gastrointestinales (causados por otras toxinas). Estos síntomas desaparecen, pero unas 48 horas más tarde sobreviene la muerte por disfunción hepática. ¿Cuál puede ser la explicación de que la α-amanitina tarde tanto tiempo en provocar la muerte?

11. Detección de cepas de la tuberculosis resistentes a la rifampicina La rifampicina es un importante antibiótico usado para tratar la tuberculosis, así como otras enfermedades causadas por micobacterium. Algunas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis, son resistentes a la rifampicina. Estas cepas se vuelven resistentes a consecuencia de mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa. La rifampicina no puede unirse a la RNA polimerasa mutante y por tanto es incapaz de bloquear el inicio de la transcripción. Las secuencias de DNA de un elevado número de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la rifampicina tienen mutaciones en una región específica de 69 pb del gen *rpoB*. Una cepa con resistencia a la rifampicina bien caracterizada tiene una única alteración en *rpoB*, que da lugar a que un residuo His sea reemplazado por un residuo Asp en la subunidad β.

(a) Sobre la base de sus conocimientos de química de proteínas, sugiera una técnica que permita la detección de una cepa resistente a la rifampicina que contenga esta mutación en particular.

(b) Sobre la base de sus conocimientos de la química de ácidos nucleicos, sugiera una técnica para identificar la forma mutante de *rpoB*.

Bioquímica en Internet

12. El gen de la ribonucleasa La ribonucleasa pancreática humana tiene 128 residuos.

(a) ¿Cuál es el número mínimo de pares de nucleótidos requerido para codificar esta proteína?

(b) El mRNA expresado en las células pancreáticas humanas fue copiado con transcriptasa inversa para crear una "genoteca" de DNA humano. La secuencia del mRNA que codifica la ribonucleasa pancreática humana fue determinada secuenciando el "DNA complementario" o cDNA de esta genoteca que contenía una pauta de lectura abierta para la proteína. Utilice la base de datos Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) para encontrar la secuencia publicada de este mRNA (busque en la base de datos CoreNucleotide el número de acceso D26129). ¿Cuál es la longitud de este RNA?

(c) ¿Cómo puede explicar la discrepancia entre el tamaño que calculó en (a) y la longitud real del mRNA?

Problema de análisis de datos

13. Un caso de edición de RNA El receptor del AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) es un com-

ponente del sistema nervioso humano. Está presente en varias formas, en diferentes neuronas; parte de esta variación resulta de modificaciones postranscripción. Este problema examina la investigación sobre el mecanismo de edición de este RNA.

Un informe inicial de Sommer y colaboradores (1991) examinó la secuencia que codifica un residuo de Arg clave del receptor del AMPA. La secuencia del cDNA (véase la Fig. 9–14) del receptor del AMPA mostró un codón CGG (Arg; véase la Fig. 27–7) para este aminoácido. Sorprendentemente, el DNA genómico mostró un codón CAG (Gln) en esta posición.

(a) Explique por qué cree que este resultado está de acuerdo con la modificación postranscripción del mRNA del receptor del AMPA.

Reuter y colaboradores (1995) exploraron este mecanismo en detalle. Primero desarrollaron un ensayo para distinguir entre transcritos editados y no editados, basado en el método de Sanger para secuenciar DNA (véase la Fig. 8–33). Modificaron la técnica para determinar si la base en cuestión era o no una A (como en CAG). Diseñaron dos cebadores de DNA basados en la secuencia genómica de esta región del gen del AMPA. Estos cebadores y la secuencia de la hebra no molde del DNA genómico de la región pertinente del gen del receptor del AMPA se muestran abajo; el residuo de A que es editado se muestra en rojo.

Para detectar si esta A estaba presente o había sido sustituida por otra base, Rueter y colaboradores utilizaron el siguiente procedimiento:

1. Prepararon cDNA complementario del mRNA, utilizando el cebador 1, transcriptasa inversa, dATP, dGTP, dCTP y dTTP.
2. Eliminaron el mRNA.
3. Hibridaron el cebador 2 marcado con ^{32}P y añadieron DNA polimerasa, dGTP, dCTP, dTTP y ddATP (didesoxi ATP; véase la Fig. 8–33).
4. Desnaturalizaron los dúplex resultantes y los separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE; p. 88).
5. Detectaron las especies de DNA marcadas con ^{32}P por autorradiografía.

Encontraron que el mRNA editado producía un [^{32}P]DNA de 22 nucleótidos, mientras que el mRNA no editado producía un [^{32}P]DNA de 19 nucleótidos.

(b) Utilizando las secuencias abajo indicadas, explique cómo los RNA editados y no editados dieron lugar a estos diferentes productos.

Utilizando el mismo procedimiento para medir la fracción de transcritos editados en diferentes condiciones, los investigadores encontraron que extractos de células epiteliales (una línea celular común denominada HeLa) podían editar el mRNA con elevada eficiencia. Para determinar la naturaleza de la maquinaria de edición trataron previamente un extracto activo de HeLa como se describe en la tabla y midieron su capacidad para editar el mRNA de AMPA. La proteinasa K degrada proteínas solamente; la nucleasa micrococal, solamente DNA.

Muestra	Pretratamiento	% mRNA editado
1	Ninguno	18
2	Proteinasa K	5
3	Calor a 65 °C	3
4	Calor a 85 °C	3
5	Nucleasa micrococal	17

(c) Utilice estos datos para argumentar que la maquinaria de edición está compuesta de proteína. ¿Cuál es la debilidad de este argumento?

Para determinar la naturaleza exacta de la base editada, Rueter y colaboradores utilizaron el siguiente procedimiento:

1. Sintetizaron mRNA con [α-^{32}P]ATP en la mezcla de reacción.
2. Editaron el mRNA marcado incubándolo con el extracto de HeLa.
3. Hidrolizaron el mRNA editado hasta nucleótidos monofosfato individuales con nucleasa P1.
4. Separaron los nucleósidos monofosfato por cromatografía en capa fina (TLC; véase la Fig. 10–24).
5. Identificaron los nucleósidos monofosfato marcados con ^{32}P por autorradiografía.

En el mRNA no editado encontraron solamente [^{32}P]AMP; en el mRNA editado encontraron sobre todo [^{32}P]AMP y algo de [^{32}P]IMP (inosina monofosfato; véase la Fig. 22–34).

(d) ¿Por qué fue necesario utilizar [α-^{32}P]ATP en lugar de [β-^{32}P]ATP o [γ-^{32}P]ATP en este experimento?

(e) ¿Por qué fue necesario utilizar [α-^{32}P]ATP en lugar de [α-^{32}P]GTP, [α-^{32}P]CTP o [α-^{32}P]UTP?

(f) ¿Cómo puede excluirse la posibilidad que el nucleótido A entero (azúcar, base y fosfato) fuese eliminado y reemplazado por I durante el proceso de edición?

A continuación los investigadores editaron mRNA que fue marcado con [2,8-^{3}H]ATP y repitieron el procedimiento anterior. Los únicos mononucleótidos marcados con ^{3}H fueron AMP e IMP.

(g) ¿Por qué este resultado excluye la eliminación de la base A (dejando la cadena azúcar-fosfato intacta) seguida del reemplazamiento con una base I como mecanismo de edición? ¿Cuál es, pues, en este caso el mecanismo más probable de edición?

(h) ¿Por qué el cambio de un residuo A por un residuo I en el mRNA explica el cambio de Gln a Arg en la secuencia proteica en las dos formas del receptor del AMPA? (Pista: Véase la Fig. 27–8.)

Referencias

Rueter, S.M., Burns, C.M., Coode, S.A., Mookherjee, P., & Emesont, R.B. (1995) Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science* **267**, 1491–1494.

Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., & Seeburg, P.H. (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* **67**, 11–19.

(5′)...GTCTCTGGTTTTCCTTGGGTGCCTTTATGCAGCAAGGATGCGATATTTCGCCAAG...
Cebador 1: CGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5′)
Cebador 2: (5′) CCTTGGGTGCCTTTA

> Obviamente, el descubrimiento de Harry (Noller) no nos dice cómo empezó la vida ni explica qué había antes del RNA. Pero como parte de un cuerpo de pruebas experimentales circunstanciales en continuo crecimiento en favor de que antes que nosotros hubo una forma de vida en este planeta, de la cual procedemos, ¡es realmente impresionante!
>
> —*Gerald Joyce, citado como comentario en* Science, *1992*

27

Metabolismo de las proteínas

Las proteínas son los productos finales de la mayoría de las rutas de la información. Cualquier célula necesita en cada instante miles de proteínas diferentes. Estas proteínas tienen que ser sintetizadas en respuesta a las necesidades celulares del momento, transportadas (dirigidas) hasta la localización celular adecuada y degradadas cuando ya no son necesarias.

Comprender la síntesis proteica, el más complejo de los mecanismos biosintéticos, ha sido uno de los mayores retos de la historia de la bioquímica. En las células eucarióticas, la síntesis proteica requiere la participación de más de 70 proteínas ribosómicas diferentes, 20 o más enzimas para activar los aminoácidos precursores, una docena o más de enzimas auxiliares y otros factores proteicos para el inicio, la elongación y la terminación de los polipéptidos; quizá unos 100 enzimas adicionales para la modificación final de las diferentes proteínas y 40 o más clases de RNA ribosómicos y de transferencia. En total, casi 300 macromoléculas diferentes tienen que cooperar para sintetizar los polipéptidos. Muchas de estas macromoléculas forman parte de la compleja estructura tridimensional de los ribosomas.

Para apreciar la importancia crucial de la síntesis proteica, conviene considerar los recursos celulares dedicados a este proceso. La síntesis proteica consume hasta el 90% de la energía química utilizada por la célula en todas las reacciones biosintéticas. Cada célula bacteriana, arqueobacteriana o eucariótica contiene desde unas cuantas hasta millares de copias de proteínas y de RNA diferentes. Los 15.000 ribosomas, las 100.000 moléculas de factores proteicos y enzimáticos relacionados y las 200.000 moléculas de tRNA presentes en una célula bacteriana típica representan más del 35% del peso seco de la célula.

A pesar de la gran complejidad de la síntesis proteica, las proteínas se fabrican a velocidades vertiginosas. Una cadena polipeptídica de 100 residuos se sintetiza en una célula de *E. coli* (a 37 °C) en aproximadamente 5 segundos. La síntesis de los millares de proteínas diferentes de una célula está estrechamente regulada para que sólo se fabrique la cantidad necesaria en las condiciones metabólicas imperantes. Para mantener la mezcla apropiada y la concentración adecuada de proteínas, los procesos de direccionamiento y degradación han de estar coordinados con la síntesis. La investigación está desvelando gradualmente el conjunto de procesos celulares que dirigen cada proteína hasta su localización celular correcta y que degradan selectivamente las proteínas cuando ya no son necesarias.

El estudio de la síntesis proteica ofrece otra importante recompensa: un panorama sobre el mundo de los catalizadores de RNA que pueden haber existido antes del establecimiento de la vida "tal como la conocemos". Se ha determinado la estructura de los cromosomas bacterianos, que ha mostrado el funcionamiento de la síntesis de proteínas celulares con gran detalle molecular. ¿Qué se ha observado? ¡Las proteínas son sintetizadas por un gigantesco enzima de RNA!

27.1 El código genético

Tres importantes descubrimientos allanaron el camino hasta el conocimiento presente de la síntesis proteica. A principios de la década de 1950, Paul Zamecnik y colaboradores diseñaron diversos experimentos para investigar en qué lugar de la célula se sintetizaban las proteínas. Inyectaron aminoácidos radiactivos a ratas y los hígados fueron extraídos, homogenados y fraccionados por centrifugación a diferentes tiempos después de la inyección. Seguidamente se analizaron las proteínas radiactivas en las fracciones subcelulares. Cuando se dejaban pasar horas o días después de la inyección de los aminoácidos marcados *todas* las fracciones subcelulares contenían proteínas marcadas. No obstante, cuando habían transcurrido sólo unos minutos se

Paul Zamecnik

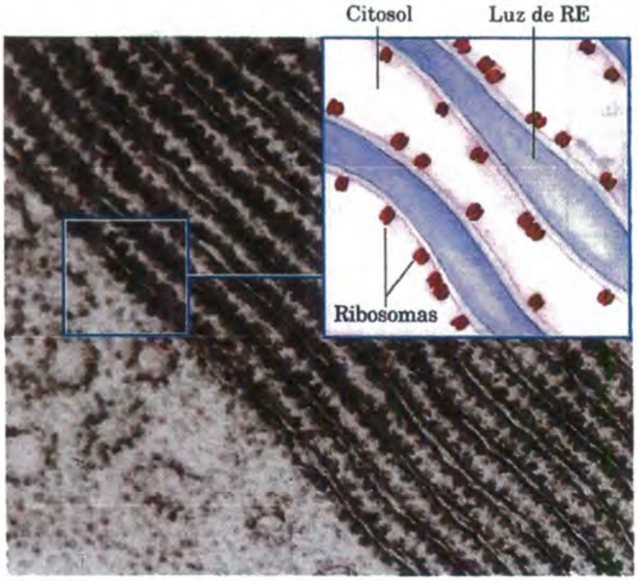


FIGURA 27–1 Ribosomas y retículo endoplasmático. La micrografía electrónica y el dibujo esquemático de una porción de célula pancreática muestran ribosomas unidos a la cara externa (citosólica) del retículo endoplasmático (RE). Los ribosomas son los numerosos puntos pequeños en el borde de las capas paralelas de membranas.

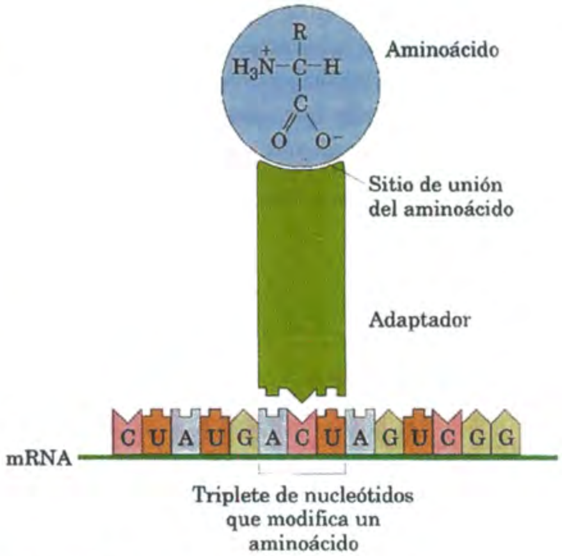


FIGURA 27–2 Hipótesis del adaptador de Crick. Actualmente sabemos que el aminoácido está unido covalentemente al extremo 3′ de la molécula de tRNA y que un triplete de nucleótidos específico en otra parte de la molécula de tRNA interacciona con un triplete específico en el mRNA mediante puentes de hidrógeno entre bases complementarias.

encontraba proteína marcada únicamente en la fracción que contenía partículas pequeñas de ribonucleoproteína. Estas partículas, visibles en los tejidos animales por microscopia electrónica, se identificaron por lo tanto como el sitio de la síntesis proteica a partir de aminoácidos; más tarde se las denominó ribosomas **(Fig. 27–1)**.

El segundo descubrimiento clave fue realizado por Mahlon Hoagland y Zamecnik, quienes encontraron que los aminoácidos eran "activados" cuando se incubaban con ATP y la fracción citosólica del hígado. Los aminoácidos se unían a una forma especial de RNA soluble y termoestable del tipo que había sido descubierto y caracterizado por Robert Holley, denominado más tarde RNA de transferencia (tRNA), formando **aminoacil-tRNA.** Los enzimas que catalizan este proceso son las **aminoacil-tRNA sintetasas.**

El tercer paso importante tuvo lugar cuando Francis Crick se preguntó de qué modo la información genética contenida en el lenguaje de 4 letras de los ácidos nucleicos podía traducirse al lenguaje de 20 letras de las proteínas. Un pequeño ácido nucleico (tal vez RNA) podría desempeñar el papel de adaptador; una parte de la molécula de adaptador se uniría a un aminoácido específico mientras que otra parte del adaptador reconocería la secuencia nucleotídica que codificara dicho aminoácido en el mRNA **(Fig. 27–2)**. Esta idea pronto fue confirmada. El tRNA adaptador "traduce" la secuencia nucleotídica de un mRNA a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. El proceso global de síntesis de proteínas guiada por mRNA a menudo se denomina simplemente **traducción.**

Estos tres avances pronto condujeron a la identificación de las principales fases de la síntesis de proteínas y finalmente a la elucidación del código genético que especifica cada uno de los aminoácidos.

El código genético fue descifrado mediante moldes de mRNA artificiales

En la década de 1960 estaba claro que se requerían al menos tres residuos nucleotídicos del DNA para codificar cada aminoácido. El código de cuatro letras del DNA (A, T, G y C) en grupos de dos sólo puede dar $4^2 = 16$ combinaciones diferentes, que no bastan para codificar los 20 aminoácidos. No obstante, cuatro bases en grupos de tres pueden dar $4^3 = 64$ combinaciones diferentes.

Algunas de las características esenciales del código genético fueron rápidamente establecidas mediante experimentos genéticos **(Figs. 27–3, 27–4)**. Un **codón** es un triplete de nu-

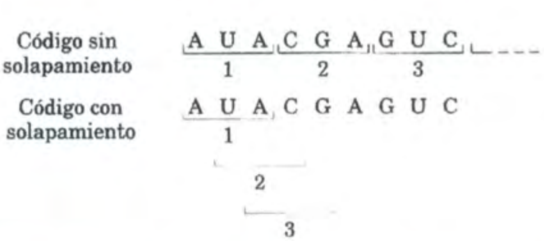


FIGURA 27–3 Un código genético con solapamiento frente a un código sin solapamiento. En un código sin solapamiento los codones (numerados de forma consecutiva) no comparten nucleótidos. En un código con solapamiento, algunos nucleótidos del mRNA son compartidos por codones diferentes. En un código de tripletes con solapamiento máximo, muchos nucleótidos, tales como el tercer nucleótido de la izquierda (A), son compartidos por tres codones diferentes. Obsérvese que en un código con solapamiento, la secuencia del triplete del primer codón limita las posibles secuencias del segundo codón. Un código sin solapamiento da mucha más flexibilidad en la secuencia de tripletes de los codones vecinos y, por tanto, en las posibles secuencias de aminoácidos especificadas por el código. El código genético utilizado en todos los sistemas vivos es sin solapamiento.

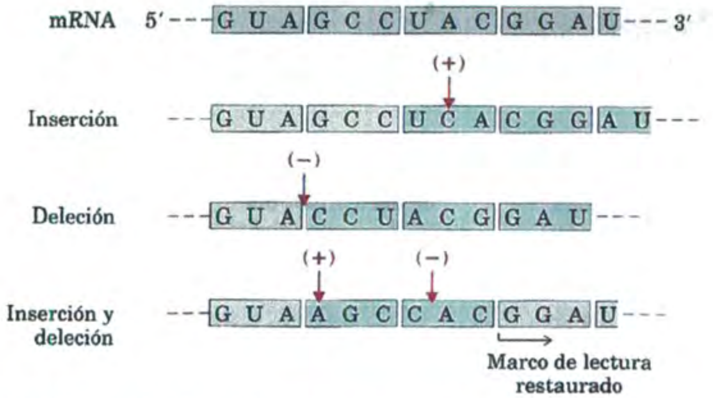


FIGURA 27–4 Código de tripletes no solapados. Los datos sobre la naturaleza general del código genético se obtuvieron a partir de muchos tipos de experimentos, entre ellos experimentos genéticos sobre los efectos de mutaciones por deleción e inserción. La inserción o deleción de un par de bases (mostrada aquí en el transcrito de mRNA) altera la secuencia de tripletes en un código sin solapamiento; todos los aminoácidos codificados por el mRNA después del cambio quedan afectados. La combinación de mutaciones por inserción y deleción afecta algunos aminoácidos, pero finalmente puede restaurar la secuencia correcta de aminoácidos. La adición o sustracción de tres nucleótidos (no mostrada) deja intactos los restantes tripletes, lo que demuestra que un codón tiene tres nucleótidos, y no cuatro o cinco. Los codones de tripletes sombreados en gris son los transcritos a partir del gen original; los codones sombreados en azul son codones nuevos resultantes de mutaciones por inserción o deleción.

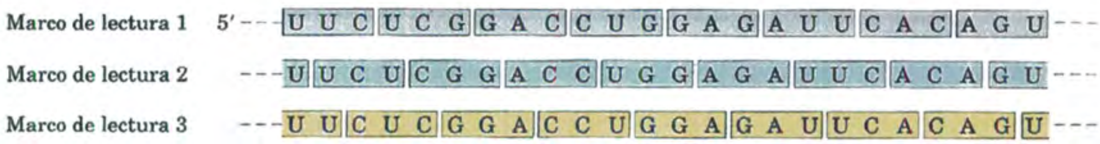


FIGURA 27–5 Marcos de lectura en el código genético. En un código de tripletes sin solapamiento, todos los mRNA tienen tres pautas de lectura potenciales. Los tripletes y, por tanto, los aminoácidos especificados, son diferentes en cada marco de lectura.

cleótidos que codifica un aminoácido específico. La traducción tiene lugar de manera que estos tripletes de nucleótidos se leen sucesivamente y sin solapamiento. Un primer codón específico determina el **marco de lectura**, en el que un nuevo codón empieza cada tres nucleótidos. No hay puntuación entre los codones de sucesivos residuos aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de una proteína está definida por una secuencia lineal de tripletes contiguos. En principio, cualquier secuencia dada de DNA de cadena sencilla o de mRNA tiene tres posibles marcos de lectura. Cada marco de lectura da una secuencia diferente de codones **(Fig. 27–5)**, pero sólo una es probable que codifique una proteína. Todavía quedaba una pregunta fundamental por responder: ¿cuáles eran las palabras de tres letras para cada aminoácido?

Marshall Nirenberg

En 1961 Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei realizaron el primer avance significativo. Incubaron poliuridilato sintético, poli(U), con un extracto de *E. coli*, GTP, ATP y una mezcla de los 20 aminoácidos en 20 tubos diferentes, cada tubo con un aminoácido diferente marcado con radioactividad. Puesto que el mRNA poli(U) está formado por muchos tripletes UUU sucesivos, debería promover la síntesis de un polipéptido que contuviera solamente el aminoácido codificado por el triplete UUU. En efecto, se formó un polipéptido radiactivo sólo en uno de los 20 tubos, el que contenía fenilalanina radiactiva. Nirenberg y Matthaei concluyeron, por tanto, que el triplete UUU codifica la fenilalanina. El mismo método demostró que el polinucleótido sintético policitidilato o poli(C) codifica un polipéptido que sólo contiene prolina (poliprolina), mientras que el poliadenilato, poli(A), codifica la polilisina. El poliguanilato no dio buenos resultados porque forma espontáneamente tetraplexes (véase la Fig. 8–20) que no pueden unirse a los ribosomas.

Los polinucleótidos sintéticos utilizados en estos experimentos se obtuvieron mediante la polinucleótido fosforilasa (p. 1049), que cataliza la formación de polímeros de RNA a partir de ADP, UDP, CDP y GDP. Este enzima, descubierto por Severo Ochoa, no requiere molde y fabrica polímeros con una composición de bases que refleja directamente la concentración relativa de los precursores nucleósido 5'-difosfato del medio. Si a la polinucleótido fosforilasa se le suministra sólo UDP, sólo fabrica poli(U). Si se le suministra una mezcla de cinco partes de ADP y una de CDP, fabricará un polímero con cinco sextos de adenilato y un sexto de citidilato. Un polímero al azar de este tipo es probable que contenga muchos tripletes con la secuencia AAA, un número menor de AAC, ACA y CAA, relativamente pocos ACC, CCA y CAC y muy pocos tripletes CCC (Tabla 27–1). Con la utilización de diferentes mRNA artificiales producidos por la polinucleótido fosforilasa a partir de mezclas de partida diferentes de ADP, GDP, UDP y CDP, los grupos de Nirenberg y Ochoa pronto identificaron la composición de bases de los tripletes que codifican la casi totalidad de los aminoácidos. Aunque estos experimentos revelaron la composición de bases de los tripletes codificantes, no pudieron desvelar su secuencia de bases.

TABLA 27–1 Incorporación de aminoácidos en polipéptidos en respuesta a polímeros aleatorios de RNA

Aminoácido	Frecuencia de incorporación observada (Lys = 100)	Asignación tentativa de la composición de nucleótidos del codón correspondiente*	Frecuencia de incorporación esperada basada en la asignación (Lys = 100)
Asparagina	24	A_2C	20
Glutamina	24	A_2C	20
Histidina	6	AC_2	4
Lisina	100	AAA	100
Prolina	7	AC_2, CCC	4,8
Treonina	26	A_2C, AC_2	24

Nota: Aquí se presenta un resumen de los datos de uno de los primeros experimentos diseñados para dilucidar el código genético. Se utilizó un RNA sintético, que sólo contenía residuos A y C en la proporción 5:1, para dirigir la síntesis del polipéptido. Se determinaron tanto la identidad como la cantidad de aminoácidos incorporados. Basándose en la abundancia relativa de residuos A y C en el RNA sintético y asignando al codón AAA (el más probable) una frecuencia de 100, debería haber tres codones de composición A_2C, cada uno con una frecuencia relativa de 20; tres codones de composición AC_2, cada uno con una frecuencia relativa de 4,0; y el codón CCC con una frecuencia relativa de 0,8. La asignación del CCC se basó en la información obtenida en estudios anteriores con poli(C). Cuando se hacen dos asignaciones tentativas de codón, se propone que ambos codifican el mismo aminoácido.

*Estas determinaciones de composición de nucleótidos no contienen información sobre la secuencia nucleotídica (excepto, claro está, en los casos de AAA y CCC).

CONVENCIÓN CLAVE: El contenido del capítulo trata en buena parte de los tRNA. El aminoácido especificado por un tRNA se indica con un superíndice, tal como $tRNA^{Ala}$ y el tRNA aminoacilado con un nombre con un guión: alanil-$tRNA^{Ala}$ o Ala-$tRNA^{Ala}$. ■

En 1964 Nirenberg y Philip Leder lograron otro avance fundamental. Encontraron que los ribosomas aislados de *E. coli* fijaban un aminoacil-tRNA específico en presencia del correspondiente polinucleótido mensajero sintético. Por ejemplo, ribosomas incubados con poli(U) y fenilalanil-$tRNA^{Phe}$ (o Phe-$tRNA^{Phe}$) fijan ambos RNA, pero si los ribosomas se incuban con poli(U) y algún otro aminoacil-tRNA, el aminoacil-tRNA no se fija porque no reconoce los tripletes UUU del poli(U) (Tabla 27–2). Incluso los trinucleótidos permitían la unión específica de los tRNA apropiados, por lo que estos experimentos pudieron realizarse con oligonucleótidos pequeños sintetizados químicamente. De esta forma fue posible determinar qué aminoacil-tRNA se fijaba a unos 54 de los 64 codones posibles. Con algunos codones, o no se fijaba ningún aminoacil-tRNA o se fijaba más de uno. Se necesitaba otro método para completar y confirmar el código genético en su totalidad.

H. Gobind Khorana

Más recientemente, H. Gobind Khorana aportó un enfoque complementario con el desarrollo de métodos que permitían sintetizar polirribonucleótidos con secuencias repetitivas de dos a cuatro bases. Los polipéptidos producidos utilizando estos mRNA tenían uno o unos pocos aminoácidos en patrones repetitivos. Estos patrones, combinados con la información obtenida a partir de los polímeros al azar utilizados por Nirenberg y colaboradores, permitieron la asignación de codones sin ningún tipo de ambigüedad. El polímero $(AC)_n$, por ejemplo, tiene codones ACA y CAC alternantes: ACACACACACACACA. El polímero sintetizado con este mensajero contenía cantidades iguales de treonina y de histidina. Dado que el codón de la histidina tiene una A y dos C (Tabla 27–1), CAC debe codificar la histidina y ACA la treonina.

Los resultados de muchos experimentos permitieron la asignación de 61 de los 64 codones posibles. Los otros tres se identificaron como codones de terminación, en parte porque destruían los patrones de codificación de aminoácidos cuando estaban presentes en la secuencia de los polímeros de RNA sintético **(Fig. 27–6)**. El significado de todos los tripletes (tabulado en la **Fig. 27–7**) fue establecido hacia 1966 y ha sido

TABLA 27–2 Trinucleótidos que inducen unión específica de aminoacil-tRNA a los ribosomas

Trinucleótido	Aumento relativo de aminoacil-tRNA marcado con ^{14}C unido al ribosoma*		
	Phe-$tRNA^{Phe}$	Lys-$tRNA^{Lys}$	Pro-$tRNA^{Pro}$
UUU	4,6	0	0
AAA	0	7,7	0
CCC	0	0	3,1

Fuente: Modificado de Nirenberg, M. & Leder, P. (1964) RNA code words and protein synthesis. *Science* **145**, 1399.

*Los números representan el factor en que aumentaba la cantidad de ^{14}C unido cuando se hallaba presente el trinucleótido indicado, en relación con el control al cual no se había añadido el trinucleótido.

Marco de lectura 1 5′ - - - G U A | A G U | A A G | U A A | G U A | A G U | A A - - - 3′

Marco de lectura 2 - - - G | U A A | G U A | A G U | A A G | U A A | G U A | A - - -

Marco de lectura 3 - - - G U | A A G | U A A | G U A | A G U | A A G | U A A | - - -

FIGURA 27–6 Efecto de un codón de terminación en un tetranucleótido repetido. Los codones de terminación (en rosa) se encuentran cada cuarto codón en los tres diferentes marcos de lectura (mostrados en diferentes colores). Se sintetizan dipéptidos o tripéptidos según el sitio en donde se una inicialmente el ribosoma.

verificado de muchas formas distintas. El descifrado del código genético está considerado como uno de los mayores descubrimientos científicos del siglo XX.

Los codones son la clave de la traducción de la información genética, que hace posible la síntesis de proteínas específicas. El marco de lectura se establece cuando empieza la traducción de una molécula de mRNA y se mantiene mientras la maquinaria de síntesis lee secuencialmente un triplete tras otro. Si el marco de lectura inicial se desplaza una o dos bases o si de algún modo la traducción pasa por alto un nucleótido en el mRNA, todos los codones siguientes estarán fuera de registro; el resultado es normalmente una proteína "sin sentido" con una secuencia de aminoácidos alterada.

Varios codones tienen funciones especiales (Fig. 27–7). El **codón de inicio** AUG es la señal más común del principio de

Primera letra del codón (extremo 5′)

Segunda letra del codón

	U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

FIGURA 27–7 "Diccionario" de las palabras del código de los aminoácidos en los mRNA. Los codones están escritos en la dirección 5′→3′. La tercera base de cada codón (en negrita) juega un papel menos importante en la especificación del aminoácido que las dos primeras. Los tres codones de terminación se indican en rojo y el codón de inicio AUG en verde. Todos los aminoácidos, excepto la metionina y el triptófano, tienen más de un codón. En la mayoría de casos, los codones que especifican el mismo aminoácido sólo difieren en la tercera base.

las cadenas polipeptídica en todas las células, además de codificar residuos Met en posiciones internas de los polipéptidos. Los **codones de terminación** (UAA, UAG y UGA), también llamados codones de paro o codones sin sentido, normalmente señalan el final de la síntesis de un polipéptido y no codifican ninguno de los aminoácidos conocidos. Algunas excepciones a estas reglas se discuten en el recuadro 27–1.

Como se describe en la Sección 27.2, el inicio de la síntesis proteica en la célula es un proceso elaborado que requiere un codón de inicio y otras señales en el mRNA. Desde la perspectiva actual, los experimentos de Nirenberg, Khorana y otros para identificar la función de los codones no debieran haber funcionado en ausencia de codones de inicio. Afortunadamente, las condiciones experimentales hicieron que los requerimientos normales para el inicio de la síntesis proteica estuviesen relajados. Una vez más en la historia de la bioquímica, el esfuerzo combinado con la buena suerte produjo un avance importante.

En una secuencia de nucleótidos al azar, uno de cada 20 codones de cada marco de lectura, es, como promedio, un codón de terminación. En general, un marco de lectura sin un codón de terminación en 50 o más codones, se denomina **marco de lectura abierto (ORF).** Los marcos de lectura abiertos largos normalmente corresponden a genes que codifican proteínas. En el análisis de las bases de datos de secuencias, se utilizan programas sofisticados para buscar marcos de lectura abiertos con el fin de encontrar genes entre la, a menudo, gran cantidad de DNA no génico. Un gen no interrumpido que codificara una proteína típica de masa molecular 60.000 requeriría un marco de lectura abierto con 500 codones o más.

Una característica destacable del código genético consiste en que un aminoácido puede ser especificado por más de un codón, por lo que el código se califica como **degenerado.** Ello *no* significa que el código sea imperfecto: aunque un aminoácido puede tener dos o más codones, cada codón especifica un solo aminoácido. La degeneración del código no es uniforme. Mientras que la metionina y el triptófano tienen un solo codón, tres aminoácidos (Leu, Ser, Arg) tienen seis codones, cinco aminoácidos tienen cuatro, la isoleucina tiene tres y nueve aminoácidos tienen dos (Tabla 27–3).

El código genético es casi universal. Con la intrigante excepción de pequeñas variaciones en las mitocondrias, algunas bacterias y algunos eucariotas unicelulares (Recuadro 27–1), los codones de los aminoácidos son idénticos en todas las especies examinadas hasta ahora. Los seres humanos, *E. coli*, las plantas del tabaco, los anfibios y los virus comparten el mismo código genético. Ello indicaría que todas las formas de vida tienen un antepasado común, cuyo código genético ha sido preservado a lo largo de toda la evolución biológica. Incluso las variaciones refuerzan esta conclusión.

RECUADRO 27-1 Excepciones que confirman la regla: variaciones naturales del código genético

En bioquímica, como en otras disciplinas, las excepciones a las reglas generales pueden ser problemáticas para los educadores y frustrantes para los estudiantes. Sin embargo, también nos enseñan que la vida es compleja y nos estimulan en la búsqueda de más sorpresas. Entender las excepciones puede incluso reforzar la regla original en formas a veces sorprendentes.

Podría parecer que queda poco margen de maniobra para cambios en el código genético. Incluso la sustitución de un solo aminoácido puede tener efectos profundamente negativos sobre la estructura de una proteína. Sin embargo, en algunos organismos se encuentran variaciones en el código que son a la vez interesantes e instructivas. La misma rareza y los tipos de estas variaciones aportan pruebas poderosas a favor de un origen evolutivo común de todos los seres vivos.

Para alterar el código se han de producir cambios en el gen, o genes, que codifican uno o varios tRNA, siendo el anticodón la diana obvia de las modificaciones. Un cambio de estas características implicaría la inserción sistemática de un aminoácido en un codón que no especifica este aminoácido según el código normal (véase la Fig. 27-7). El código genético está definido, en efecto, por dos elementos: (1) los anticodones de los tRNA (que determinan en qué lugar se coloca un aminoácido en un polipéptido en formación) y (2) la especificidad de los enzimas —las aminoacil-tRNA sintetasas— que cargan los tRNA y deciden la identidad del aminoácido unido a un determinado tRNA.

Debido a los efectos catastróficos que la mayoría de cambios súbitos del código tendrían sobre las proteínas celulares, es de suponer que las alteraciones del código sólo tengan lugar en casos que afecten a relativamente pocas proteínas. Esto podría suceder en genomas pequeños que codifican sólo unas pocas proteínas. Las consecuencias biológicas de un cambio de código se podrían limitar también restringiendo los cambios a los tres codones de terminación, ya que no aparecen *dentro* de los genes (véase el Recuadro 27-4 para excepciones a *esta* regla). En efecto, se ha podido observar este patrón.

La mayoría de las muy escasas variaciones del código genético ocurren en el DNA mitocondrial (mtDNA), que sólo codifica de 10 a 20 proteínas. Las mitocondrias tienen sus propios tRNA y sus variaciones en el código no afectan a los genomas celulares, mucho más grandes. Los cambios más comunes en las mitocondrias (y los únicos cambios de código observados en los genomas celulares) afectan a los codones de terminación de los productos de sólo un subconjunto de genes, y a veces los efectos sobre estos genes tienen poca entidad porque los genes tienen múltiples (redundantes) codones de terminación.

Los mtDNA de los vertebrados tienen genes que codifican 13 proteínas, dos rRNA y 22 tRNA (véase la Fig. 19-38). El pequeño número de reasignaciones de codones, junto con un conjunto de reglas de balanceo poco comunes (p. 1072), permite que los 22 tRNA sean suficientes para descodificar los genes de las proteínas, en lugar de los 32 tRNA requeridos por el código normal. En las mitocondrias, estos cambios pueden ser contemplados como una forma de mejorar la eficiencia genómica, ya que un genoma más pequeño confiere una ventaja replicativa al orgánulo. Cuatro familias de codones (en las que el aminoácido está determinado enteramente por los dos primeros nucleótidos) son descodificados por un único tRNA con un residuo U en la primera posición (de balanceo) del anticodón. O bien la U se aparea de alguna forma con cualquiera de las cuatro bases posibles en la tercera posición del codón, o bien se utiliza un mecanismo "dos de tres", es decir que no se necesita apareamiento en la tercera posición. Otros tRNA reconocen codones con A o G en la tercera posición, mientras que otros reconocen U o C, de modo que virtualmente todos los tRNA reconocen dos o cuatro codones.

En el código normal sólo la metionina y el triptófano son especificados por codones únicos (véase la Tabla 27-3). Si todos los tRNA mitocondriales reconocen dos codones, sería de esperar la existencia de codones adicionales para Met y Trp en las mitocondrias. Y así observamos que la variación más comúnmente observada en el código sea que el codón de terminación UGA especifique triptófano. El $tRNA^{Trp}$ reconoce e inserta un residuo Trp, tanto en el codón de terminación UGA como en el codón normal del Trp, UGG. La conversión del codón AUA de la Ile en un codón de Met es la segunda variación más frecuente; el

TABLA 27-3 Degeneración del código genético

Aminoácido	Número de codones	Aminoácido	Número de codones
Met	1	Tyr	2
Trp	1	Ile	3
Asn	2	Ala	4
Asp	2	Gly	4
Cys	2	Pro	4
Gln	2	Thr	4
Glu	2	Val	4
His	2	Arg	6
Lys	2	Leu	6
Phe	2	Ser	6

El balanceo permite que algunos tRNA reconozcan más de un codón

Cuando un aminoácido es especificado por múltiples codones, la diferencia entre ellos normalmente se encuentra en la tercera base (en el extremo 3′). Por ejemplo, la alanina está codificada por los tripletes GCU, GCC, GCA y GCG. Los codones de casi todos los aminoácidos se pueden simbolizar por XY^{A}_{G} o XY^{U}_{C}. Las dos primeras letras de cada codón son los determinantes primarios de la especificidad, hecho que tiene interesantes consecuencias.

Los RNA de transferencia se aparean con los codones del mRNA mediante una secuencia de tres bases del tRNA denominada **anticodón.** La primera base del codón del mRNA (leído en dirección 5′→3′) se aparea con la tercera base del anticodón **(Fig. 27-8a)**. Si el triplete del anticodón de un tRNA determinado reconociese solamente un codón mediante apareamiento

TABLA 1 Asignaciones de las variantes conocidas del código mitocondrial	Codones*				
	UGA	AUA	AGA AGG	CUN	CGG
Asignaciones del código normal	Stop	Ile	Arg	Leu	Arg
Animales					
Vertebrados	Trp	Met	Stop	+	+
Drosophila	Trp	Met	Ser	+	+
Levaduras					
Saccharomyces cerevisiae	Trp	Met	+	Thr	+
Torulopsis glabrata	Trp	Met	+	Thr	?
Schizosaccharomyces pombe	Trp	+	+	+	+
Hongos filamentosos	Trp	+	+	+	+
Tripanosomas	Trp	+	+	+	+
Plantas superiores	+	+	+	+	Trp
Chlamydomonas reinhardtii	?	+	+	+	?

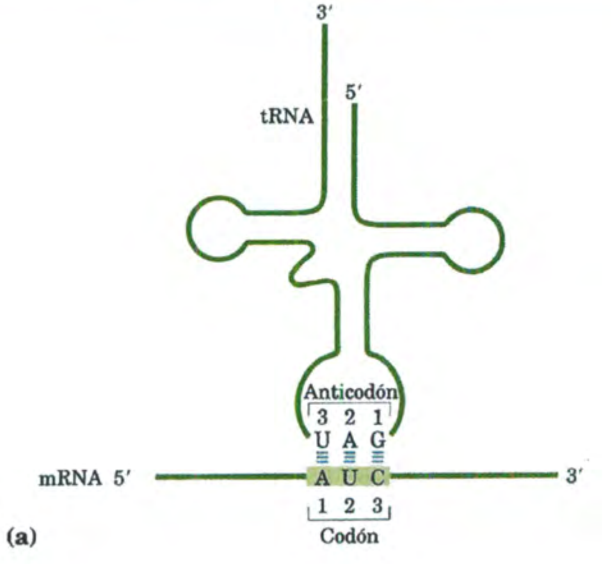
*N indica cualquier nucleótido; +, el codón tiene el mismo significado que en el código normal; ? codón no observado en el genoma mitocondrial indicado.

codón normal de Met es AUG y un único tRNA puede reconocer ambos codones. Las variaciones conocidas del código de las mitocondrias se muestran en la Tabla 1.

Pasando a los cambios mucho más raros en los códigos de genomas celulares (en contraposición con los mitocondriales), la única variación conocida en una bacteria es de nuevo la utilización de UGA para codificar residuos Trp, encontrada en la célula más sencilla capaz de vida libre, *Mycoplasma capricolum*. En los eucariotas, los únicos cambios de codificación extramitocondriales conocidos tienen lugar en unas pocas especies de protistas ciliados, en los que los dos codones de terminación UAA y UAG especifican glutamina. También hay algunos casos, raros pero interesantes, de codones de terminación que se han adaptado para codificar aminoácidos no pertenecientes a los 20 estándar, tal como se detalla en el Recuadro 27–3.

Los cambios en el código no tienen por qué ser absolutos; un codón no tiene por qué codificar siempre el mismo aminoácido. En muchas bacterias se usa ocasionalmente el codón GUG (Val) como codón de inicio que especifica Met. Sucede solamente en los genes en los que GUG está situado adecuadamente en relación a determinadas secuencias del mRNA que afectan el inicio de la traducción (tal como se discute en la Sección 27.2).

Estas variaciones nos dicen que el código no es tan universal como anteriormente se creía, pero que su flexibilidad está severamente limitada. Las variaciones obviamente derivan del código normal y no se ha encontrado ningún ejemplo de código completamente diferente. El alcance limitado de las variantes del código refuerza el principio de que todas las formas de vida en este planeta han evolucionado sobre la base de un único (ligeramente flexible) código genético.



de Watson-Crick en las tres posiciones, las células tendrían un tRNA diferente para cada codón de un aminoácido. Sin embargo no es así, porque los anticodones de algunos tRNA contienen el nucleótido inosinato (designado por I), que contiene la base poco frecuente hipoxantina (véase la Fig. 8–5b). El inosi-

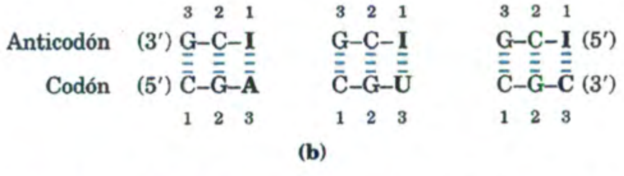


FIGURA 27–8 Relación de apareamiento del codón y el anticodón. (a) El alineamiento de los dos RNA es antiparalelo. El tRNA se representa en la configuración tradicional en hoja de trébol. (b) Son posibles tres diferentes relaciones de apareamiento del codón cuando el anticodón del tRNA contiene inosinato.

nato puede formar puentes de hidrógeno con tres nucleótidos diferentes (U, C y A; Fig. 27–8b), si bien estos apareamientos son mucho más débiles que los puentes de hidrógeno de los pares de bases de Watson-Crick (G≡C y A═U). En la levadura, un $tRNA^{Arg}$ tiene el anticodón (5′)ICG, que reconoce tres codones diferentes de la arginina, (5′)CGA, (5′)CGU y (5′)CGC. Las dos primeras bases son idénticas (CG) y forman pares de bases fuertes tipo Watson-Crick con las correspondientes bases del anticodón, pero la tercera base (A, U o C) forma puentes de hidrógeno bastante débiles con el residuo I en la primera posición del anticodón.

El examen de estos y otros apareamientos codón-anticodón llevaron a Crick a la conclusión de que la tercera base de la mayoría de codones se aparea débilmente con la correspondiente base de los anticodones; en su lenguaje gráfico, la tercera base de tales codones (y la primera base de sus correspondientes anticodones) "se balancea". Crick propuso un conjunto de cuatro relaciones denominadas **hipótesis del balanceo:**

1. Las primeras dos bases de un codón del mRNA siempre forman pares de bases fuertes del tipo Watson-Crick con las bases correspondientes del anticodón del tRNA, y son responsables de la mayor parte de la especificidad del código.
2. La primera base del anticodón (leído en la dirección 5′→3′ y apareado con la tercera base del codón) determina el número de codones reconocidos por el tRNA. Cuando la primera base del anticodón es C o A, el apareamiento es específico y sólo es reconocido un codón por el tRNA. Cuando la primera base es U o G, la unión es menos específica y pueden leerse dos codones. Cuando la inosina (I) es el primer nucleótido (de balanceo) del anticodón, pueden reconocerse tres codones diferentes, el máximo para cualquier tRNA. Estas relaciones están resumidas en la Tabla 27–4.
3. Cuando un aminoácido es especificado por varios codones diferentes, los codones que difieren en cualquiera de las dos primeras bases requieren tRNA diferentes.
4. Para traducir los 61 codones se requiere un mínimo de 32 tRNA (31 para codificar los aminoácidos y 1 para el inicio).

La base de balanceo (o tercera base) del codón contribuye a la especificidad, pero dado que sólo se aparea débilmente con la correspondiente base del anticodón, permite la disociación rápida del tRNA de su codón durante la síntesis proteica. Si las tres bases de los codones del mRNA formasen apareamientos fuertes de Watson-Crick con las tres bases de los anticodones, los tRNA se disociarían demasiado lentamente, con lo que la velocidad de síntesis de proteínas se vería gravemente limitada. Las interacciones codón-anticodón equilibran los requerimientos de precisión y velocidad.

El código genético nos dice de qué modo la información sobre la secuencia de las proteínas está almacenada en los ácidos nucleicos y proporciona indicaciones sobre la traducción de esta información a proteína. A continuación examinaremos los mecanismos moleculares que tienen lugar durante el proceso de traducción.

TABLA 27–4 Determinación del número de codones que puede reconocer un tRNA por la base de balanceo del anticodón

1. Un codón reconocido:

Anticodón	(3′) X – Y – **C** (5′)	(3′) X – Y – **A** (5′)
Codón	(5′) X′ – Y′ – **G** (3′)	(5′) X′ – Y′ – **U** (3′)

2. Dos codones reconocidos:

Anticodón	(3′) X – Y – **U** (5′)	(3′) X – Y – **G** (5′)
Codón	(5′) X′ – Y′ – **A/G** (3′)	(5′) X′ – Y′ – **C/U** (3′)

3. Tres codones reconocidos:

Anticodón	(3′) X – Y – **I** (5′)
Codón	(5′) X′ – Y′ – **A/U/C** (3′)

Nota: X e Y indican bases complementarias capaces de apareamiento de bases fuerte del tipo Watson-Crick con X′ e Y′, respectivamente. Las bases en las posiciones de balanceo (la posición 3′ de los codones y la posición 5′ de los anticodones) están coloreadas en rosa.

El desplazamiento del marco de traducción y la edición de RNA afectan la lectura del código

Una vez establecido el marco de lectura durante la síntesis proteica, los codones se traducen sin solapamiento ni puntuación hasta que el complejo ribosómico topa con un codón de terminación. Las otras dos posibles pautas de lectura normalmente no contienen información genética útil, pero unos pocos genes están estructurados de tal forma que los ribosomas llegados a un cierto punto de la traducción de sus mRNA cambian de marco de lectura. Este mecanismo puede permitir tanto la síntesis de dos o más proteínas distintas, pero relacionadas, a partir de un único transcrito como la regulación de la síntesis de una proteína.

Uno de los ejemplos mejor documentados de **desplazamiento del marco de traducción** ocurre durante la traducción del mRNA de los genes solapados *gag* y *pol* del virus del sarcoma de Rous (véase la Fig. 26–35). El marco de lectura de *pol* está desplazado un par de bases hacia la izquierda (pauta de lectura –1) en relación con el marco de lectura de *gag* **(Fig. 27–9)**.

El producto del gen *pol* (la transcriptasa inversa) se traduce como una poliproteína de mayor tamaño a partir del mismo mRNA utilizado para la proteína *gag* sola (véase la Fig. 26–34). La poliproteína o proteína *gag-pol* es cortada para obtener la transcriptasa inversa madura mediante digestión proteolítica. La producción de la poliproteína requiere un desplazamiento de la pauta de traducción en la región de solapamiento para permitir que el ribosoma eluda el codón de terminación AUG al final del gen *gag* (rosa en la Fig. 27–9).

El desplazamiento del marco de lectura se produce en aproximadamente el 5% de las traducciones de este mRNA, con lo que la poliproteína *gag-pol* (y finalmente la transcriptasa inversa) se sintetiza con una frecuencia veinte veces menor que la proteína *gag*, nivel suficiente para la reproducción eficiente del

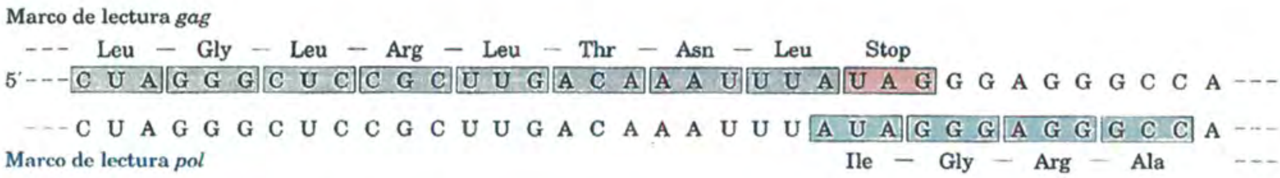


FIGURA 27–9 Desplazamiento del marco de traducción en un transcrito retrovírico. Se muestra la región *gag–pol* de solapamiento del RNA del virus del sarcoma de Rous.

virus. En algunos retrovirus, otro desplazamiento del marco de traducción hace posible la traducción de una proteína aun más larga, que contiene el producto del gen *env* fusionado a los productos génicos de *gag* y *pol* (véase la Fig. 26–34). Un mecanismo similar produce las subunidades τ y γ de la DNA polimerasa III de *E. coli* a partir de un único transcrito del gen *dnaX* (véase la Tabla 25–2).

Algunos mRNA son editados antes de la traducción. La **edición de RNA** consiste en la adición, la deleción o la alteración de nucleótidos en el RNA que afecta al significado del transcrito cuando se traduce. La adición o deleción de nucleótidos se ha observado principalmente en los RNA derivados de los genomas de mitocondrias y cloroplastos de eucariotas. Las reacciones requieren una clase especial de moléculas de RNA codificadas en estos mismos orgánulos, con secuencias complementarias de los RNA editados. Estos RNA guía (gRNA; **Fig. 27–10**) actúan de molde en el proceso de edición.

Los transcritos iniciales de los genes que codifican la subunidad II de la citocromo oxidasa de las mitocondrias de algunos protozoos son un ejemplo de edición por inserción. Estos transcritos no se adecúan exactamente a la secuencia del extremo carboxilo-terminal del producto proteico. Un proceso de edición postranscripción inserta cuatro residuos U que desplazan el marco de traducción del transcrito. La Figura 27–10 muestra los residuos U añadidos en la pequeña parte del transcrito afectada por la edición. Observe que el apareamiento de bases entre el transcrito inicial y el RNA guía implica una serie de pares de bases G═U (puntos azules), que son comunes en las moléculas de RNA.

La edición de RNA por alteración de nucleótidos consiste comúnmente en la desaminación enzimática de residuos de adenosina o citidina para formar inosina o uridina, respectivamente **(Fig. 27–11)**, aunque también se han descrito otros cambios de base. La inosina se interpreta como un residuo G en

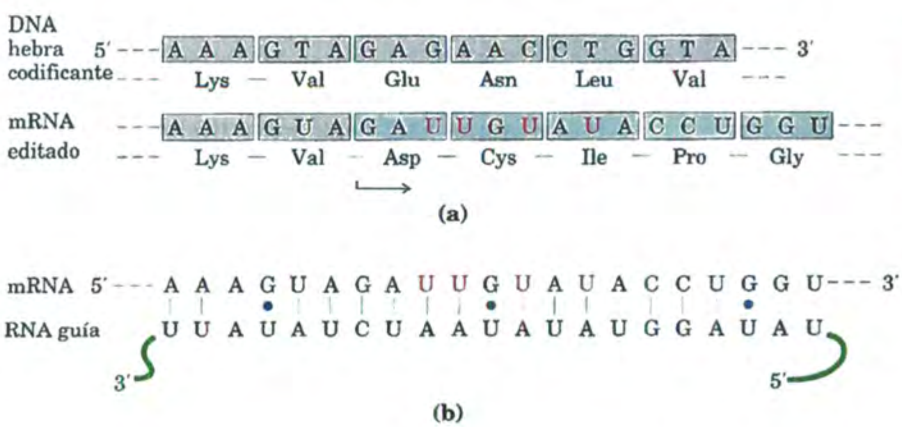


FIGURA 27–10 Edición de RNA en el transcrito del gen de la subunidad II del gen de la citocromo oxidasa de las mitocondrias de *Trypanosoma brucei*. **(a)** La inserción de cuatro residuos U (rosa) genera un marco de lectura alterado. **(b)** Una clase especial de RNA guía, complementarios del producto editado, actúan de molde para el proceso de edición. Observe la presencia de dos pares de bases G═U, señalados por un punto azul para indicar apareamiento no de Watson-Crick.

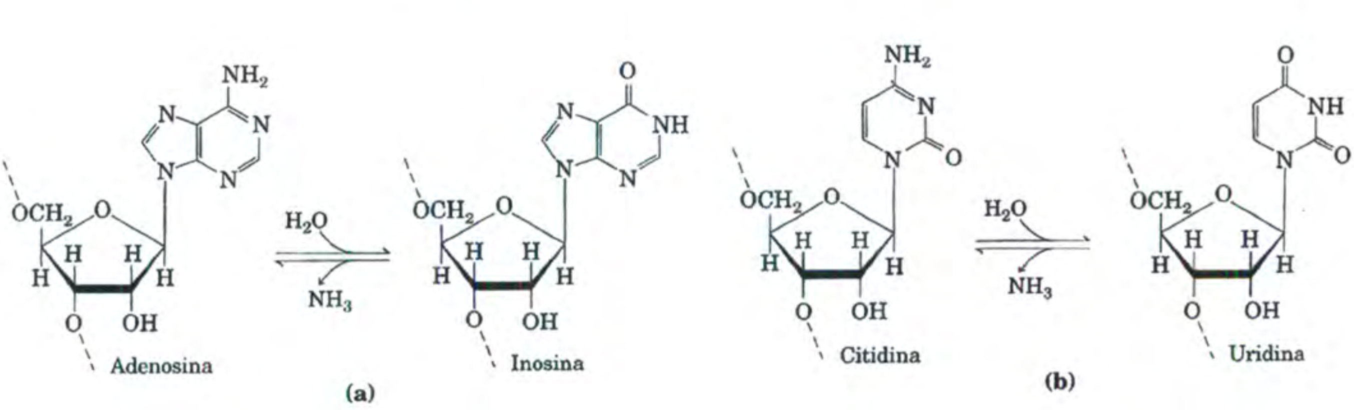


FIGURA 27–11 Reacciones de desaminación en la edición de RNA. **(a)** La conversión de los nucleótidos de adenosina en nucleótidos de inosina está catalizada por enzimas ADAR. **(b)** Las conversiones de citidina a uridina están catalizadas por la familia de enzimas APOBEC.

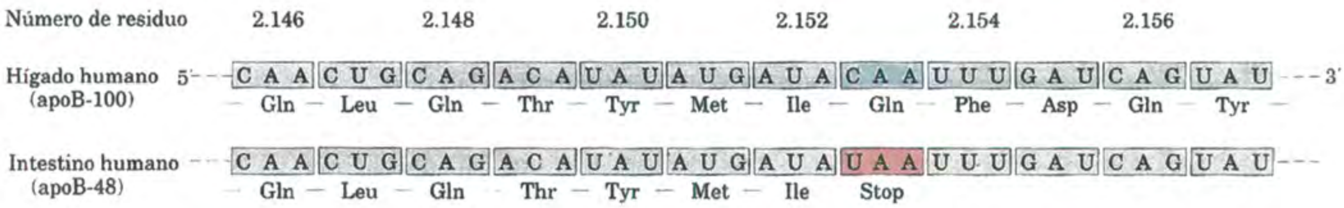


FIGURA 27–12 Edición del RNA del transcrito del gen del componente apoB-100 de las LDL. La desaminación, que ocurre sólo en el intestino, convierte una citidina específica en una uridina, lo cual cambia un codón de Gln en un codón de terminación, que provoca la síntesis de una proteína truncada.

la traducción. Las reacciones de desaminación de la adenosina se llevan a cabo por *a*denosina *d*esaminasas que *a*ctúan sobre el *R*NA **(ADAR)**. Las desaminaciones de la citidina se llevan a cabo por la familia de enzimas del péptido *c*atalítico para la *e*dición del mRNA de *apoB* **(APOBEC),** entre las que se encuentran las desaminasas inducidas por activación relacionadas con la misma **(AID).** Ambos grupos de enzimas de desaminación poseen un dominio catalítico homólogo con zinc coordinado.

Un ejemplo bien estudiado de edición de RNA por desaminación ocurre en el gen del componente apolipoproteína B de la lipoproteína de baja densidad de los vertebrados. Una forma de la apolipoproteína B, apoB-100 (M_r 513.000), se sintetiza en el hígado; una segunda forma, apoB-48 (M_r 250.000), se sintetiza en el intestino. Ambas están codificadas por un mRNA producido a partir del gen de la apoB-100. Una citidina desaminasa APOBEC presente sólo en el intestino se une al mRNA en el codón del residuo aminoácido 2.153 (CAA = Gln) y convierte la C en U, para crear un codón de terminación UAA. La apoB-48 producida en el intestino a partir de este mRNA modificado es simplemente una forma abreviada (correspondiente a la mitad amino-terminal) de apoB-100 **(Fig. 27–12)**. Esta reacción permite la síntesis específica de tejido de dos proteínas diferentes a partir de un solo gen.

La edición de A a I promovida por ADAR es muy común en transcritos procedentes de los primates. La edición se presenta en un 90% o más en los elementos cortos dispersos (SINE) denominados elementos Alu (véase la Fig. 24–8). Hay más de un millón de elementos Alu de 300 pb en el DNA humano, que representan alrededor del 10% del genoma. Están concentrados cerca de los genes codificantes de proteínas, a menudo en los intrones y en las regiones no traducidas de los extremos 3′ y 5′ de los transcritos. Los mRNA humanos recién sintetizados (antes de ser procesados) contienen *generalmente* de 10 a 20 elementos Alu. Los enzimas ADAR se unen y promueven la edición de A a I sólo en las regiones de doble cadena del RNA. Los abundantes elementos Alu ofrecen muchas oportunidades de apareamiento de bases intramolecular dentro de los transcritos, que suministran las dianas dúplex requeridas por las ADAR. La edición también puede afectar a las regiones codificantes de los genes. El funcionamiento defectuoso de las ADAR se ha relacionado con diversos desórdenes neurológicos, entre los que se encuentran la esclerosis lateral amiotrófica, la epilepsia y la depresión profunda.

Los genomas de todos los vertebrados están repletos de SINE, pero en la mayoría de estos organismos se encuentran muchos tipos diferentes de SINE. Los elementos Alu predominan solamente en los primates. El escrutinio detallado de genes y transcritos indica que la edición de A a I es de 30 a 40 veces más frecuente en humanos que en ratones, debido en gran parte a la presencia de muchos elementos Alu. La edición de A a I a gran escala, junto con una mayor frecuencia de corte y empalme alternativo (véase la Fig. 26–22) son dos características que distinguen el genoma de los primates del de otros mamíferos. No está claro todavía si estas reacciones son accidentales o si jugaron un papel clave en la evolución de los primates y, en último término, de los humanos.

RESUMEN 27.1 El código genético

- La secuencia de aminoácidos particular de una proteína se construye a partir de la traducción de la información codificada en el mRNA. Este proceso corre a cargo de los ribosomas.
- Los aminoácidos están especificados por codones del mRNA, consistentes en tripletes de nucleótidos. La traducción requiere moléculas adaptadoras, los tRNA, que reconocen los codones e insertan los aminoácidos en sus posiciones secuenciales apropiadas en el polipéptido.
- Las secuencias de bases de los codones se dedujeron de experimentos que utilizaban mRNA sintéticos de composición y secuencia conocidas.
- El codón AUG señala el inicio de la traducción. Los tripletes UAA, UAG y UGA son señales de terminación.
- El código genético es degenerado: tiene múltiples codones para casi todos los aminoácidos.
- El código genético estándar es universal para todas las especies, con algunos cambios menores en las mitocondrias y en unos pocos organismos unicelulares.
- La tercera posición de cada codón es mucho menos específica que la primera y la segunda; por ello se dice que balancea.
- El desplazamiento del marco de traducción y la edición de RNA afectan la lectura del código genético durante la traducción.

27.2 Síntesis de proteínas

Tal como hemos visto con el DNA y el RNA (Capítulos 25 y 26), la síntesis de biomoléculas poliméricas se puede analizar en términos de fases de inicio, elongación y terminación. Estos procesos fundamentales están flanqueados por dos etapas adicionales: la activación de los precursores con anterioridad a la síntesis y la maduración postsintética del polímero completo. La síntesis de proteínas sigue este mismo patrón. La activación de los aminoácidos antes de su incorporación en los polipéptidos y la modificación postraducción del polipéptido una vez completado desempeñan papeles muy importantes que aseguran la fidelidad de la síntesis y el correcto funcionamiento del producto proteico. Los componentes celulares implicados en las cinco etapas de la síntesis proteica en *E. coli* y otras bacterias están recogidos en la Tabla 27–5; los requerimientos de las células eucarióticas son muy similares, aunque los componentes pueden ser más numerosos. Un repaso general de las cinco etapas de la síntesis proteica puede ser útil en el análisis posterior.

La biosíntesis de las proteínas tiene lugar en cinco etapas

Fase 1: Activación de los aminoácidos La síntesis de un polipéptido de secuencia definida exige el cumplimiento de dos requerimientos químicos fundamentales: (1) el grupo carboxilo de cada aminoácido debe ser activado para facilitar la formación del enlace peptídico, y (2) se tiene que establecer una relación entre cada nuevo aminoácido y la información contenida en el mRNA. Ambos requerimientos están garantizados gracias a la unión del aminoácido al tRNA en la primera etapa de la síntesis proteica. La unión del aminoácido correcto al tRNA que le corresponde es determinante. Esta reacción tiene lugar en el citosol y no en los ribosomas. Cada uno de los 20 aminoácidos se une mediante enlace covalente a un tRNA específico, consumiendo en este proceso energía del ATP y utilizando enzimas activadores dependientes de Mg^{2+}, denominados aminoacil-tRNA sintetasas. Se afirma que los tRNA que están unidos a su aminoácido (aminoacilados) están "cargados".

TABLA 27–5 Componentes requeridos en las cinco fases principales de la síntesis de proteínas en *E. coli*

Fase	Componentes esenciales
1. Activación de aminoácidos	20 aminoácidos 20 aminoacil-tRNA sintetasas 32 o más tRNA ATP Mg^{2+}
2. Iniciación	mRNA *N*-Formilmetionil-$tRNA^{fMet}$ Codón de inicio en el mRNA (AUG) Subunidad ribosómica 30S Subunidad ribosómica 50S Factores de inicio (IF-1, IF-2, IF-3) GTP Mg^{2+}
3. Elongación	Ribosoma 70S funcional (complejo de inicio) Aminoacil-tRNA especificados por codones Factores de elongación (EF-Tu, EF-T, EF-G) GTP Mg^{2+}
4. Terminación y reciclado del ribosoma	Codón de terminación en el mRNA Factores de liberación (RF-1, RF-2, RF-3, RRF) EF-G IF-3
5. Plegamiento y modificación y postraducción	Enzimas específicos, cofactores y otros componentes para la eliminación de residuos de inicio y secuencias señal, modificación proteolítica adicional, modificación de residuos terminales y unión de grupos acetilo, fosforilo, metilo, glúcidos o grupos prostéticos

TABLA 27–6 Componentes de RNA y proteínas del ribosoma de *E. coli*

Subunidad	Número de proteínas diferentes	Número total de proteínas	Designación de las proteínas	Número y tipo de rRNA
30S	21	21	S1–S21	1 (16S rRNA)
50S	33	36	L1–L36*	2 (5S y 23S rRNA)

*Las denominaciones de L1 a L36 no corresponden a 36 proteínas diferentes. La proteína originalmente designada como L7 es de hecho una forma modificada de L12, y L8 es un complejo de otras tres proteínas. L26 resultó ser la misma proteína que S20 (y no pertenece a la subunidad 50S). Todo ello resulta en 33 proteínas diferentes para la subunidad grande. Hay cuatro copias de la proteína L7/L12; las tres copias adicionales elevan el número total de proteínas a 36.

Fase 2: Inicio El mRNA portador del código del polipéptido que se tiene que sintetizar se une a la menor de las dos subunidades ribosómicas y al aminoacil-tRNA iniciador. La subunidad ribosómica mayor se une a continuación para formar el complejo de inicio. El aminoacil-tRNA iniciador se aparea con el codón AUG del mRNA, el cual señala el principio del polipéptido. Todo este proceso, que para que pueda llevarse a cabo requiere GTP, es promovido por proteínas citosólicas específicas, denominadas factores de inicio.

Fase 3: Elongación El polipéptido naciente se alarga mediante la unión covalente de sucesivas unidades de aminoácidos, transportada cada una al ribosoma y posicionada correctamente por su tRNA, que se aparea con su correspondiente codón en el mRNA. La elongación requiere proteínas citosólicas, denominadas factores de elongación. La fijación de los aminoacil-tRNA entrantes y el desplazamiento del ribosoma a lo largo del mRNA están facilitados por la hidrólisis de GTP, a medida que los residuos son añadidos al polipéptido en crecimiento.

Fase 4: Terminación y reciclado del ribosoma La finalización de la cadena polipeptídica está señalada por un codón de terminación del mRNA. A continuación la cadena polipeptídica se desprende del ribosoma con ayuda de proteínas denominadas factores de liberación, y el ribosoma es reciclado para una nueva ronda de síntesis.

Fase 5: Plegamiento y procesamiento postraducción Para adoptar su forma biológicamente activa, el nuevo polipéptido tiene que plegarse en su conformación tridimensional adecuada. Antes o después del plegamiento, el nuevo polipéptido puede experimentar modificaciones enzimáticas, incluida la eliminación de uno o más aminoácidos (habitualmente del extremo amino-terminal); la adición de grupos acetilo, fosforilo, metilo, carboxilo u otros grupos a ciertos residuos aminoácidos; el corte proteolítico, y/o la unión de oligosacáridos o de grupos prostéticos.

Antes de analizar en detalle estas cinco fases, tenemos que examinar dos componentes clave de la biosíntesis de proteínas: el ribosoma y los tRNA.

El ribosoma es una compleja máquina supramolecular

Las células de *Escheridia coli* contienen 15.000 ribosomas o más, que representan casi una cuarta parte del peso seco de la célula. Los ribosomas bacterianos contienen un 65% de rRNA y un 35% de proteína. Tienen un diámetro de unos 18 nm y están compuestos de dos subunidades diferentes con coeficientes de sedimentación de 30S y 50S y un coeficiente de sedimentación combinado de 70S. Ambas subunidades contienen docenas de proteínas ribosómicas y al menos un rRNA de gran tamaño (Tabla 27–6).

Masayasu Nomura

A partir del descubrimiento de Zamecnik de que los ribosomas son los complejos responsables de la síntesis proteica y de la elucidación del código genético, el estudio de los ribosomas experimentó un notable impulso. A finales de la década de 1960, Masayasu Nomura y colaboradores demostraron que ambas subunidades ribosómicas pueden disociarse en sus componentes RNA y proteína y ser a posteriori reconstituidas in vitro. Bajo condiciones experimentales adecuadas, las subunidades se ensamblan de forma espontánea, formando subunidades 30S o 50S casi idénticas en cuanto a estructura y actividad a las subunidades nativas. Este hallazgo fundamental fue determinante durante décadas de investigación de la estructura y la función de los RNA y las proteínas ribosómicas.

Al mismo tiempo, métodos estructurales cada vez más sofisticados fueron revelando más y más detalles referentes a la estructura del ribosoma.

Con el inicio del nuevo milenio se conocieron las primeras estructuras de alta resolución de las subunidades de los ribosomas bacterianos que fueron fuente de numerosas sorpresas **(Fig. 27–13)**. En primer lugar se desplazó el énfasis tradicional en los componentes proteicos. Las subunidades ribosómicas son grandes moléculas de RNA. En la subunidad 50S, los rRNA 5S y 23S forman el núcleo estructural. Las proteínas son elementos secundarios del complejo que decoran la superficie; en segundo lugar, y lo que es más importante, hasta una distancia

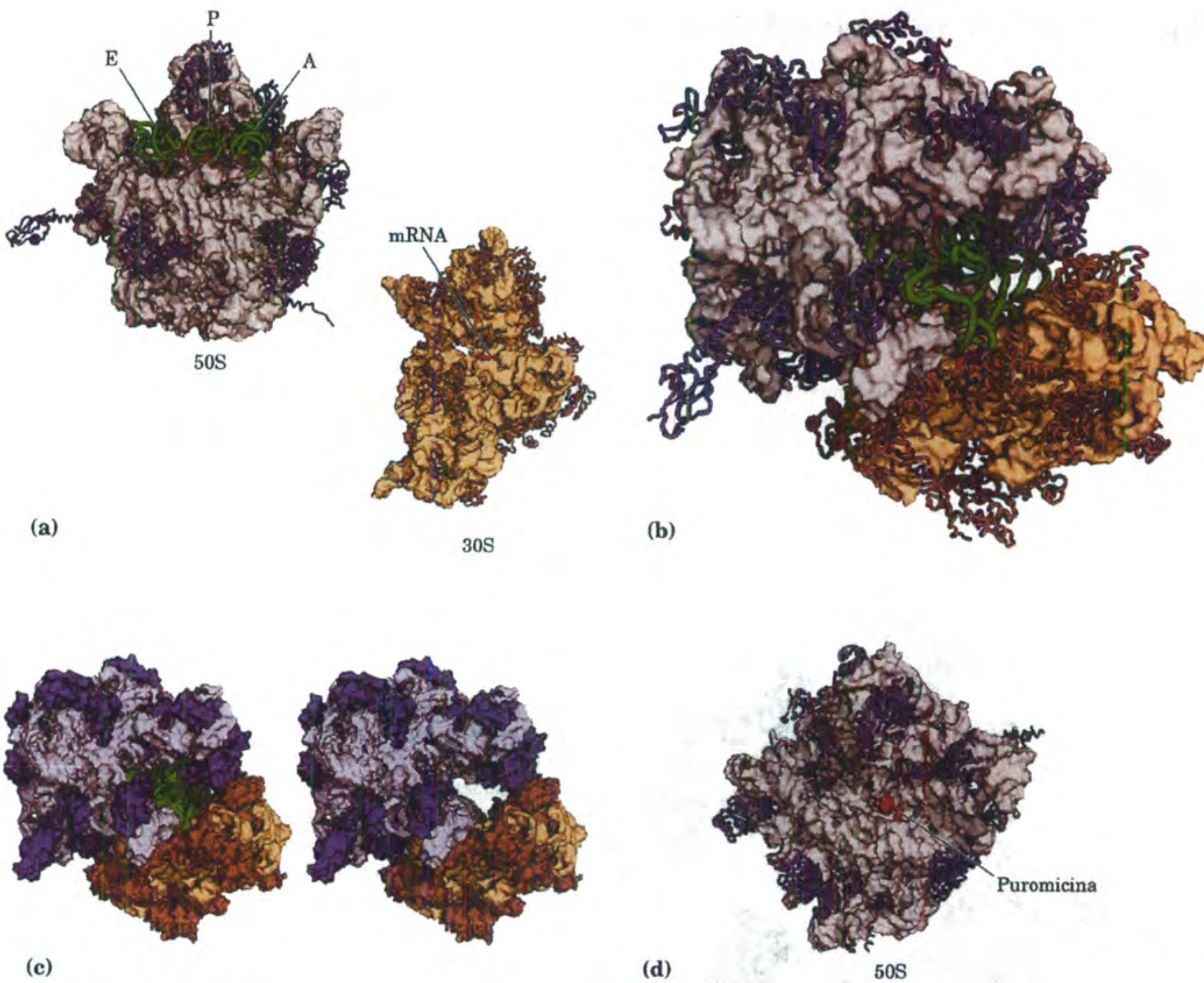


FIGURA 27–13 El ribosoma bacteriano. Nuestra comprensión de la estructura de los ribosomas ha mejorado enormemente gracias a las múltiples imágenes de alta resolución del ribosoma bacteriano y sus subunidades aportadas por diferentes grupos de investigación. Aquí se presentan unas cuantas **(a)** Subunidades bacterianas 50S y 30S separadas para mostrar las superficies que interaccionan en el ribosoma activo. La estructura de la izquierda corresponde a la subunidad 50S (procedente de PDB ID 2OW8, 1VSA y 1GIX) con tRNA (mostrados en verde) unidos a los sitios E, P y A, descritos más adelante en el texto; los anticodones del tRNA se muestran en rojo. Las proteínas se representan como estructuras tipo gusano en color azul; las características de la superficie de los rRNA en gris. La estructura de la derecha es la subunidad 30S (derivada de PDB ID 2OW8). Los esqueletos proteicos son estructuras tipo gusano en marrón y el rRNA en marrón más claro. La parte del mRNA que interacciona con los anticodones del tRNA se muestra en rojo. El resto del mRNA (no mostrado) se contorsiona a través de los surcos o canales de la superficie de la subunidad 30S. **(b)** Modelo de un ribosoma bacteriano ensamblado y activo visto perpendicularmente al surco que separa las subunidades (derivado de PDB ID 2OW8, 1VSA y 1GIX). Todos los componentes están coloreados como en **(a)**. **(c)** Un par de imágenes de ribosomas con la misma orientación que en **(b)**, pero con todos los componentes mostrados en su superficie para enfatizar la masa de la estructura entera. En la estructura de la derecha se ha omitido el tRNA para una mejor visión de la hendidura donde se produce la síntesis proteica. **(d)** La subunidad 50S del ribosoma bacteriano (PDB ID 1Q7Y). La subunidad es de nuevo vista del lado que se une a la subunidad 30S, pero ligeramente inclinada hacia abajo en relación a **(a)**. El sitio activo para la formación del enlace peptídico (la actividad peptidil transferasa), en el fondo de un surco superficial y lejos de cualquier proteína, está marcada por la unión de un inhibidor, la puromicina (rojo).

de 18 Å del sitio activo para la formación del enlace peptídico no se encuentra proteína. La estructura de alta resolución confirma lo que se sospechaba hacía más de una década: el ribosoma es un ribozima. Además de lo que enseñan sobre el mecanismo de la síntesis proteica (tal como se describe más adelante), las estructuras detalladas del ribosoma y de sus subunidades han estimulado una nueva visión sobre la evolución de la vida (Recuadro 27–2).

El ribosoma bacteriano es complejo, con una masa molecular combinada de ~2,7 millones. Las dos subunidades ribosómicas de forma irregular encajan y forman una hendidura a través de la cual pasa el mRNA a medida que se mueve el ribo-

RECUADRO 27–2 De un mundo de RNA a un mundo de proteína

Los ribozimas existentes promueven uno u otro de dos tipos de reacciones: el corte hidrolítico de enlaces fosfodiéster o transferencias de fosforilo (Capítulo 26). En ambos casos, los sustratos de las reacciones son también moléculas de RNA. Los RNA ribosómicos representan una importante expansión de las posibilidades catalíticas de los ribozimas conocidos. Los estudios de laboratorio sobre las posibilidades catalíticas del RNA (véase el Recuadro 26–3) hacen cada vez más atractiva la idea de un mundo de RNA como precursor de las formas de vida actuales.

Para ser viable, un mundo de RNA requeriría un RNA capaz de autorreplicación, un metabolismo primitivo para generar los necesarios ribonucleótidos precursores y una frontera celular para concentrar los precursores y aislarlos del medio. La necesidad de disponer de catalizadores para las reacciones de un número creciente de metabolitos y macromoléculas pudo favorecer la aparición de mayores y más complejos catalizadores de RNA. Los numerosos grupos fosforilo cargados negativamente del esqueleto del RNA limitan la estabilidad de las moléculas de RNA muy grandes. En un mundo de RNA, los cationes divalentes u otros grupos cargados positivamente podrían aumentar la estabilidad al incorporarse a las estructuras.

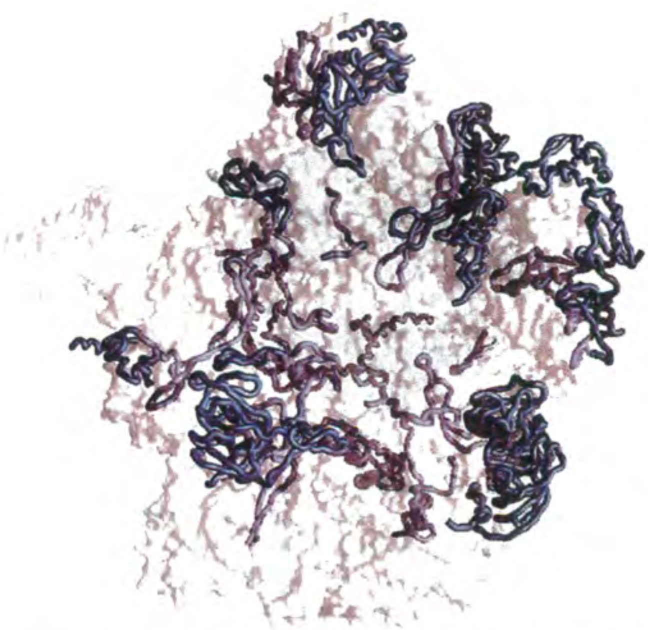


FIGURA 1 La subunidad 50S de un ribosoma bacteriano (PDB ID 1NKW). El esqueleto de las proteínas se muestra como estructuras de tipo gusano de color azul; los componentes rRNA son transparentes. Las extensiones no estructuradas de muchas de las proteínas ribosómicas serpentean entre las estructuras del rRNA, estabilizándolas.

Algunos péptidos pudieron estabilizar grandes moléculas de RNA. Por ejemplo, muchas proteínas ribosómicas en las modernas células eucarióticas tienen largas extensiones carentes de estructura secundaria, que serpentean en el interior de los RNA y contribuyen a estabilizarlos (Fig. 1). La síntesis de péptidos catalizada por ribozimas pudo haber evolucionado inicialmente como parte de una solución general para el mantenimiento de la estructura de las grandes moléculas de RNA. La síntesis de péptidos pudo haber contribuido a la estabilidad de los grandes ribozimas, pero este logro posiblemente significó el principio del fin del mundo de RNA. Una vez fue posible la síntesis de péptidos, el mayor potencial catalítico de las proteínas debió poner en movimiento una transición irreversible hacia un sistema metabólico dominado por las proteínas.

La mayoría de procesos enzimáticos fueron entonces cedidos a las proteínas –pero no todos. En todos los organismos, la tarea fundamental de sintetizar proteínas sigue siendo, incluso ahora, un proceso catalizado por ribozimas. Aparentemente, existe un solo (o un número muy pequeño) ordenamiento de residuos nucleótidos en el sitio activo de un ribozima capaz de catalizar la síntesis de péptidos. Los residuos del rRNA que parecen estar implicados en la actividad peptidil transferasa de los ribosomas están muy conservados en los rRNA de la subunidad grande de todas las especies. Utilizando la evolución in vitro (SELEX; véase el Recuadro 26–3), se han aislado ribozimas artificiales que promueven la síntesis de péptidos. Sorprendentemente, la mayoría contienen el octeto de ribonucleótidos (5′)AUAACAGG(3′), una secuencia muy conservada encontrada en el sitio activo peptidil transferasa de los ribosomas de todas las células. Es posible que sólo exista una solución del problema químico general de la síntesis de proteínas de secuencia definida catalizada por ribozimas. La evolución encontró una vez la solución y ninguna forma viviente ha podido mejorarla de manera notable.

---

soma durante la traducción. (Fig. 27–13b). Las 57 proteínas de los ribosomas bacterianos son muy diversas en tamaño y estructura. Las masas moleculares varían entre 6.000 y 75.000. La mayoría de proteínas tienen dominios globulares, que se encuentran dispuestos en la superficie del ribosoma. Algunas poseen prolongaciones sinuosas que se introducen en el interior del rRNA del ribosoma estabilizando su estructura. Las funciones de algunas de estas proteínas todavía no se conocen en detalle, aunque parece evidente que muchas de ellas desempeñan un papel estructural.

Ya se conocen actualmente las secuencias de los rRNA de muchos organismos. Cada uno de los tres rRNA de cadena sencilla de *E. coli* tiene una estructura tridimensional específica con abundante apareamiento de bases intracatenario. La estructura secundaria predicha para los rRNA **(Fig. 27–14)** ha sido en gran parte confirmada por los modelos de alta resolución, pero no incorpora la extensa red de interacciones terciarias presente en la estructura completa.

Los ribosomas de las células eucarióticas (aparte de los de las mitocondrias y los cloroplastos) son mayores y más comple-

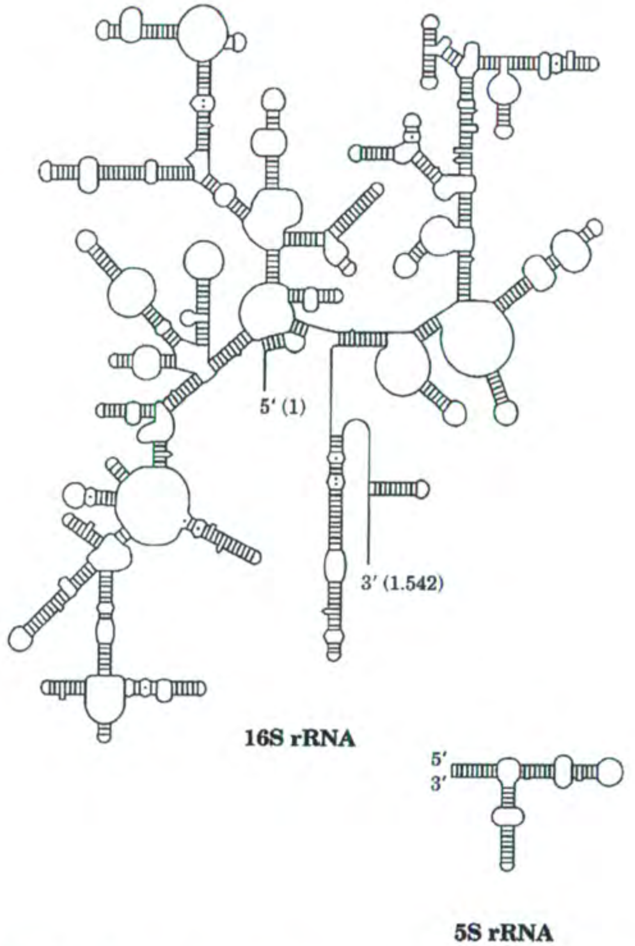


FIGURA 27–14 rRNA bacterianos. Modelos de la estructura secundaria de los rRNA 16S y 5S de *E. coli*. Los nucleótidos primero (extremo 5′) y último (extremo 3′) del rRNA 16S están numerados.

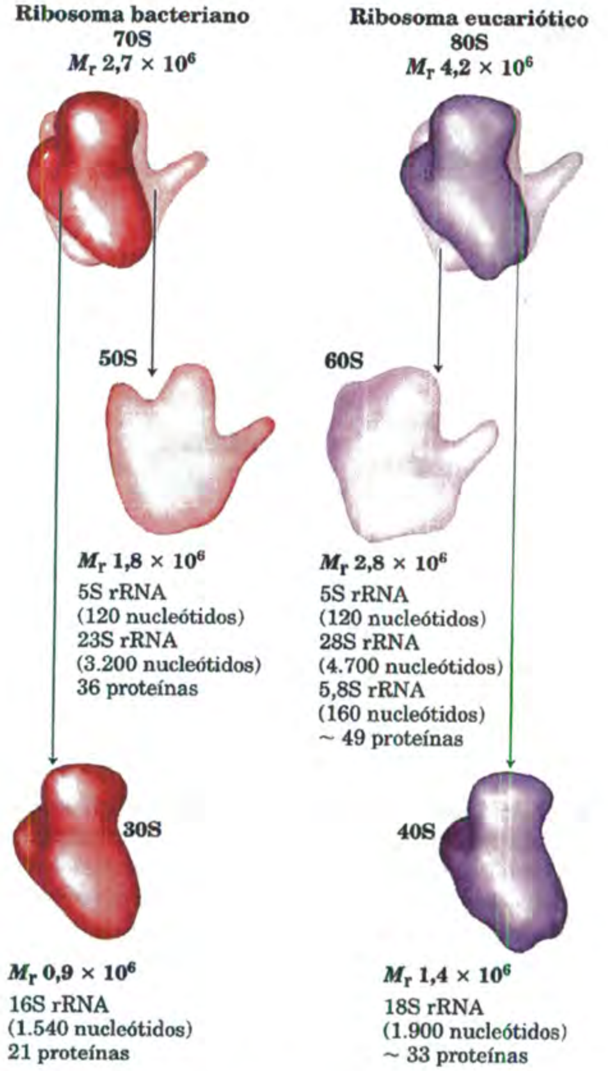


FIGURA 27–15 Resumen de la composición y la masa de los ribosomas en las bacterias y los eucariotas. Las subunidades ribosómicas se identifican por su valor S (en unidades Svedberg), coeficientes de sedimentación que son una medida de su velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga. Los valores de S no son necesariamente aditivos cuando se combinan las subunidades porque las velocidades de sedimentación dependen no sólo de la masa sino también de la forma.

jos que los ribosomas bacterianos **(Fig. 27–15)**. Tienen un diámetro de unos 23 nm y un coeficiente de sedimentación de unos 80S. También tienen dos subunidades cuyo tamaño varía según las especies, pero que por término medio corresponde a 60S y 40S. Los ribosomas eucarióticos contienen en total más de 80 proteínas diferentes. Los ribosomas de las mitocondrias y de los cloroplastos son ligeramente más pequeños y sencillos que los ribosomas bacterianos. Sin embargo, la estructura ribosómica es sorprendentemente similar en todos los organismos y orgánulos.

Los RNA de transferencia tienen rasgos estructurales característicos

Para poder entender de qué modo pueden actuar los tRNA como adaptadores en la traducción del lenguaje de los ácidos nucleicos al de las proteínas, antes tenemos que examinar su estructura con más detalle. Los RNA de transferencia son relativamente pequeños y consisten en una sola hebra de RNA plegada en una estructura tridimensional precisa (véase la Fig. 8–25a). Los tRNA de las bacterias y del citosol de los eucariotas tienen entre 73 y 93 residuos nucleótidos, que corresponden a masas moleculares entre 24.000 y 31.000. Las mitocondrias y los cloroplastos contienen tRNA diferentes, que son algo menores. Las células poseen al menos una clase de tRNA para cada aminoácido; se requieren al menos 32 tRNA para reconocer todos los codones de los aminoácidos (algunos reconocen más de un codón), si bien algunas células utilizan más de 32.

El tRNA de la alanina ($tRNA^{Ala}$) procedente de levadura, el primer ácido nucleico secuenciado por completo **(Fig. 27–16)**, contiene 76 residuos nucleótidos, diez de los cuales tienen bases modificadas. La comparación de tRNA de varias especies ha puesto de manifiesto muchos aspectos estructurales comunes **(Fig. 27–17)**. Ocho o más residuos nucleótidos tienen bases y azúcares modificados, muchos de los cuales son derivados meti-

Robert W. Holley, 1922–1993

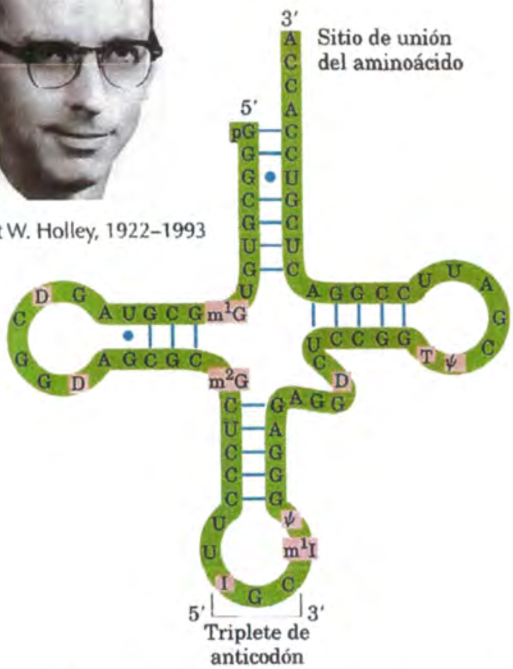


FIGURA 27–16 Secuencia nucleotídica del tRNA^{Ala} de levadura. Estructura deducida por Robert W. Holley y colaboradores en 1965 en la conformación en hoja de trébol, en la cual el apareamiento de bases intracatenario es máximo. Se utilizan los siguientes símbolos para los nucleótidos modificados (sombreados en rosa): ψ, pseudouridina; I, inosina; T, ribotimidina; D, 5,6-dihidrouridina; m^{1}I, 1-metilinosina; m^{1}G, 1-metilguanosina; m^{2}G, N^2-dimetilguanosina (véase la Figura 26–23). Las líneas azules entre las secciones paralelas indican los pares de bases de Watson y Crick. En los RNA, la guanosina se encuentra a menudo apareada con uridina aunque el par G=U no es tan estable como el par G≡C de Watson–Crick (Capítulo 8). El anticodón puede reconocer tres codones para la alanina (GCA, GCU y GCC). Otras características de la estructura del tRNA se muestran en las Figuras 27–17 y 27–18.

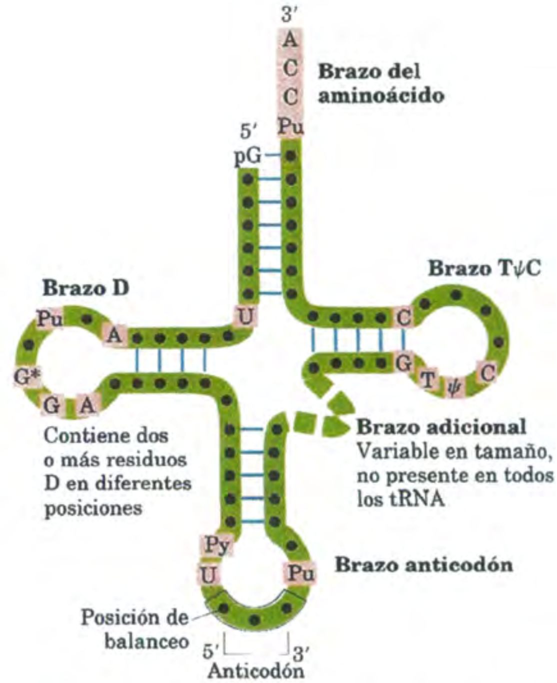


FIGURA 27–17 Estructura secundaria general en hoja de trébol de los tRNA. Los puntos grandes de la cadena fosfodiéster representan residuos nucleotídicos; las líneas azules representan pares de bases. Los residuos característicos y/o invariables comunes a todos los tRNA están coloreados en rosa. La longitud de los RNA de transferencia varía entre 73 y 93 nucleótidos. Aparecen nucleótidos adicionales en el brazo adicional o en el brazo D. En el extremo del brazo del anticodón se encuentra el bucle del anticodón, que contiene siempre siete nucleótidos no apareados. El brazo D contiene dos o tres residuos D (5,6-dihidrouridina), según el tRNA. En algunos tRNA el brazo D sólo tiene tres pares de bases unidos por puentes de hidrógeno. Además de los símbolos definidos en la Fig. 27–16, hay que añadir: Pu, nucleótido purínico; Py, nucleótido pirimidínico; G*, guanilato o 2′-*O*-metilguanilato.

lados de las bases principales. La mayoría de tRNA tienen un residuo guanilato (pG) en el extremo 5′ y todos tienen la secuencia trinucleotídica CCA(3′) en el extremo 3′. Cuando se representan en dos dimensiones, la disposición de los puentes de hidrógeno de todos los tRNA forma una estructura en forma de hoja de trébol con cuatro brazos; los tRNA más largos tienen un quinto brazo, o brazo extra corto (Fig. 27–17). En tres dimensiones, el tRNA tiene forma de L retorcida **(Fig. 27–18)**.

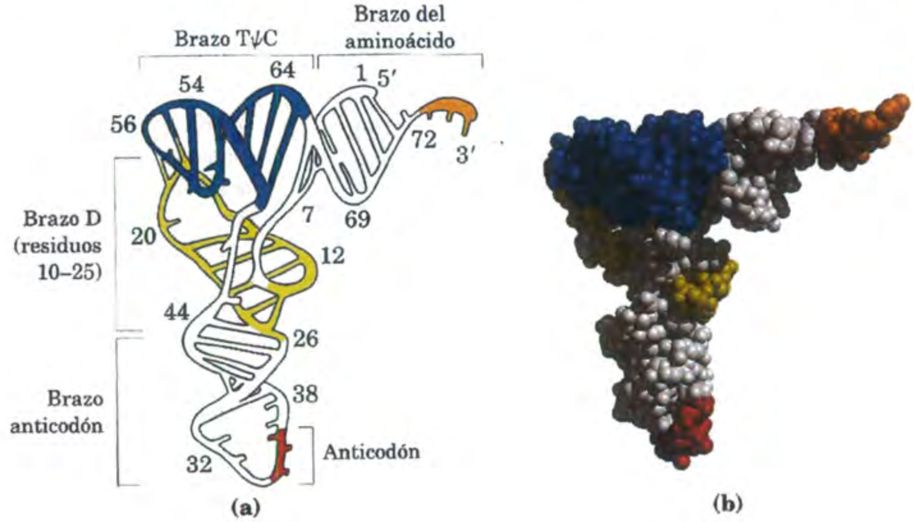


FIGURA 27–18 Estructura tridimensional del tRNA^{Phe} de levadura deducida por análisis de difracción de rayos X. La forma es parecida a una L retorcida. **(a)** Esquema con los diferentes brazos identificados en la Fig. 27–17 en diferentes colores. **(b)** Modelo espacial (PDB ID 4TRA). El código de colores es el mismo en ambas representaciones. La secuencia CCA del extremo 3′ (naranja) es el sitio de unión del aminoácido.

Dos de los brazos del tRNA son esenciales para su función de adaptador. El **brazo del aminoácido** puede llevar un aminoácido específico esterificado por su grupo carboxilo al grupo hidroxilo 2′ o 3′ del residuo A del extremo 3′ del tRNA. El **brazo del anticodón** contiene el anticodón. Los otros brazos principales son el **brazo D,** que contiene el nucleótido infrecuente dihidrouridina (D), y el **brazo TψC,** que contiene ribotimidina (T), que no se encuentra normalmente en los RNA, y pseudouridina (ψ), que tiene un enlace carbono–carbono inusual entre la base y la ribosa (véase la Fig. 26–23). Los brazos D y TψC tienen una contribución importante en el plegamiento de las moléculas de tRNA y el brazo TψC interacciona con el rRNA de la subunidad grande.

Habiendo examinado las estructuras de los ribosomas y de los tRNA, consideraremos a continuación las cinco etapas de la síntesis proteica.

Etapa 1: Las aminoacil-tRNA sintetasas unen los aminoácidos correctos a sus tRNA

Durante la primera fase de la síntesis proteica, que tiene lugar en el citosol, los 20 aminoácidos diferentes son esterificados con sus correspondientes tRNA por las aminoacil-tRNA sintetasas. Cada enzima es específico de un aminoácido y de uno o más de los tRNA correspondientes. La mayor parte de organismos tienen una aminoacil-tRNA sintetasa para cada aminoácido. En el caso de aminoácidos a los que correspondan dos o más tRNA, normalmente el mismo enzima los aminoacila a todos.

Se han determinado las estructuras de todas las aminoacil-tRNA sintetasas de *E. coli*. Se han dividido en dos clases (Tabla 27–7), basadas en diferencias en las estructuras primaria y terciaria y en el mecanismo de reacción **(Fig. 27–19)**. Las dos clases se encuentran en todos los organismos y no hay pruebas de un antepasado común. Se desconocen las razones biológicas, químicas o evolutivas de la existencia de dos clases de enzimas implicados en procesos esencialmente idénticos.

La reacción catalizada por una aminoacil-tRNA sintetasa es

$$\text{Aminoácido} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

TABLA 27–7 Dos clases de aminoacil-tRNA sintetasas

Clase I		Clase II	
Arg	Leu	Ala	Lys
Cys	Met	Asn	Phe
Gln	Trp	Asp	Pro
Glu	Tyr	Gly	Ser
Ile	Val	His	Thr

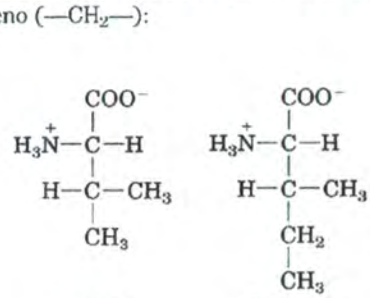
Nota: Aquí Arg representa arginil-tRNA sintetasa, etc. La clasificación es válida para todos los organismos en los que se han analizado las tRNA sintetasas y se basa en diferencias estructurales de las proteínas y en la distinción mecánica esbozada en la Figura 27-19.

Esta reacción tiene lugar mediante dos pasos en el sitio activo del enzima. En el paso (1) (Fig. 27–19), se forma un intermedio ligado al enzima, el aminoacil adenilato (aminoacil-AMP). En el segundo paso, se transfiere el grupo aminoacilo desde el aminoacil-AMP unido al enzima a su correspondiente tRNA específico. El curso de este segundo paso depende de la clase a la que pertenezca el enzima, tal como muestran las rutas (2a) y (2b) de la Fig. 27–19. El enlace éster resultante entre el aminoácido y el tRNA **(Fig. 27–20)** tiene una energía libre estándar de hidrólisis muy negativa ($\Delta G'^\circ$ = −29 kJ/mol). El pirofosfato formado en la reacción de activación se hidroliza a fosfato por la pirofosfato inorgánico hidrolasa. Se consumen, por tanto, un total de *dos* enlaces fosfato de alta energía por cada molécula de aminoácido activada, de modo que la reacción global resulta prácticamente irreversible:

$$\text{Aminoácido} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + 2\text{P}_i$$
$$\Delta G'^\circ \approx -29 \text{ kJ/mol}$$

Corrección de pruebas por las aminoacil-tRNA sintetasas. La aminoacilación del tRNA consigue dos objetivos: (1) la activación de un aminoácido para formar un enlace peptídico y (2) la unión del aminoácido a un tRNA adaptador que asegura la colocación apropiada del aminoácido en una cadena polipeptídica en crecimiento. La identidad del aminoácido unido al tRNA no se comprueba en el ribosoma, por lo que la unión del aminoácido correcto a cada tRNA es esencial para la fidelidad de la síntesis proteica.

Como se recordará del Capítulo 6, la especificidad enzimática está limitada por la energía de unión que puede obtenerse de las interacciones enzima-sustrato. La discriminación entre dos aminoácidos sustrato similares se ha estudiado detalladamente en el caso de la Ile-tRNA sintetasa, que distingue entre la valina y la isoleucina, aminoácidos que difieren solamente en un grupo metileno ($—CH_2—$):

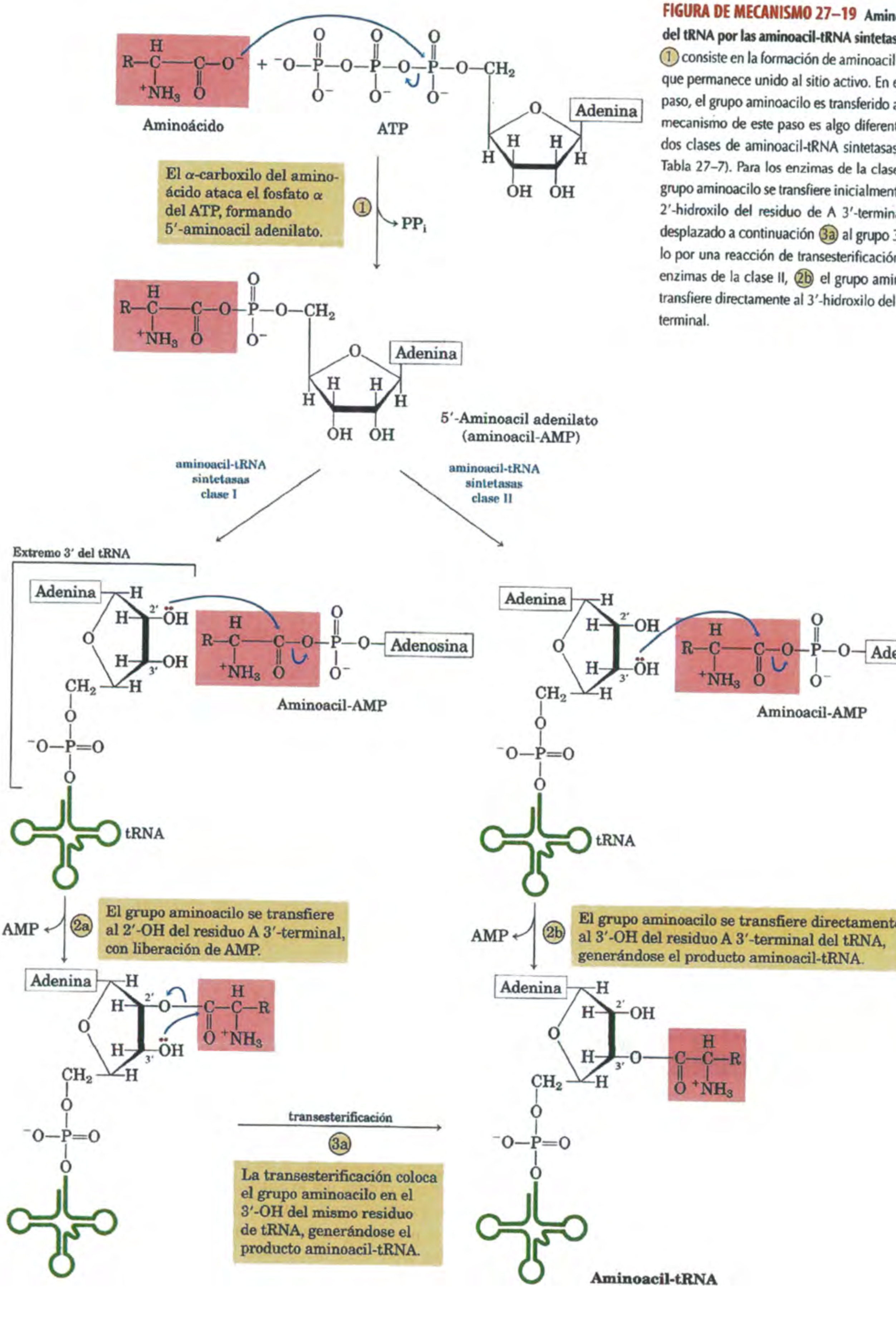


Valina Isoleucina

La Ile-tRNA sintetasa favorece la activación de la isoleucina (para formar Ile-AMP) sobre la valina en un factor de 200, como es de esperar de la contribución de un grupo metileno (en la Ile) a la unión del sustrato. No obstante, la valina se incorpora erróneamente a las proteínas en posiciones normalmente ocupadas por la isoleucina con una frecuencia de sólo 1 en 3.000. ¿Cómo se obtiene esta mejora de más de diez veces en la precisión? La Ile-tRNA sintetasa, como otras aminoacil-tRNA sintetasas, desempeña una función de corrección de pruebas.

Recuerde un principio general de la corrección de pruebas por las DNA polimerasas (p. 982): si las interacciones de unión

FIGURA DE MECANISMO 27–19 Aminoacilación del tRNA por las aminoacil-tRNA sintetasas. El paso ① consiste en la formación de aminoacil adenilato, que permanece unido al sitio activo. En el segundo paso, el grupo aminoacilo es transferido al tRNA. El mecanismo de este paso es algo diferente para las dos clases de aminoacil-tRNA sintetasas (véase la Tabla 27–7). Para los enzimas de la clase I, ②a el grupo aminoacilo se transfiere inicialmente al grupo 2′-hidroxilo del residuo de A 3′-terminal, siendo desplazado a continuación ③a al grupo 3′-hidroxilo por una reacción de transesterificación. Para los enzimas de la clase II, ②b el grupo aminoacilo se transfiere directamente al 3′-hidroxilo del adenilato terminal.



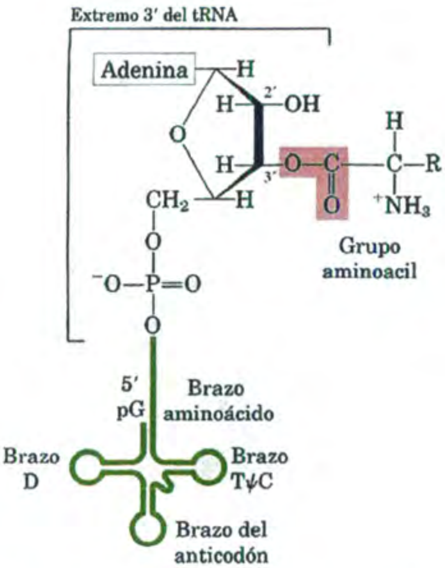


FIGURA 27–20 Estructura general de los aminoacil-tRNA. El grupo aminoacilo está esterificado en la posición 3′ del residuo A terminal. El enlace éster que a la vez activa el aminoácido y lo une al tRNA está representado en color rosa.

no proporcionan una discriminación suficiente entre dos sustratos, la especificidad necesaria puede conseguirse por la unión específica del sustrato mediante *dos pasos sucesivos*. El efecto de forzar al sistema a través de dos filtros sucesivos es multiplicativo. En el caso de la Ile-tRNA sintetasa, el primer filtro es la unión inicial del aminoácido al enzima y su activación a aminoacil-AMP. El segundo filtro consiste en la unión de los aminoacil-AMP *incorrectos* a otro sitio activo del enzima. Los sustratos que se unen a este segundo sitio activo son hidrolizados. El grupo R de la valina es ligeramente menor que el de la isoleucina; así, el Val-AMP encaja en el sitio hidrolítico (de corrección de pruebas) de la Ile-tRNA sintetasa, pero no así el Ile-AMP. De esta forma, Val-AMP se hidroliza a valina y AMP en el sitio activo de corrección de pruebas y el tRNA unido a la sintetasa no acaba siendo aminoacilado con el aminoácido incorrecto.

Además de la corrección de pruebas después de la formación del intermedio aminoacil-AMP, la mayoría de aminoacil-tRNA sintetasas también pueden hidrolizar el enlace éster entre los aminoácidos y el tRNA en los aminoacil-tRNA. Esta hidrólisis se acelera mucho en el caso de tRNA cargados de manera correcta, con lo que se consigue un tercer filtro para potenciar la fidelidad del proceso global. Las pocas aminoacil-tRNA sintetasas que activan aminoácidos sin análogos estructurales (Cys-tRNA sintetasa, por ejemplo) muestran poca o ninguna actividad de corrección de pruebas; en estos casos, el sitio activo de aminoacilación puede discriminar suficientemente entre el sustrato correcto y cualquier aminoácido incorrecto.

La tasa de error media de la síntesis de proteínas (~1 error por 10^4 aminoácidos incorporados) no es tan baja como la de la replicación del DNA. Los errores en una proteína son eliminados cuando la proteína es degradada y, por lo tanto, no pasan a generaciones sucesivas, de modo que tienen menor importancia biológica. El grado de fidelidad de la síntesis proteica es suficiente como para asegurar que la mayoría de proteínas no contengan errores y que la enorme cantidad de energía necesaria para sintetizar una proteína no sea desaprovechada. Una copia defectuosa de una determinada molécula proteica carece de importancia en presencia de muchas copias correctas de la misma proteína.

Interacción entre la aminoacil-tRNA sintetasa y el tRNA: Un "segundo código genético" Una determinada aminoacil-tRNA sintetasa tiene que ser específica no sólo de un único aminoácido sino también de ciertos tRNA. La discriminación entre docenas de tRNA es tan importante para la fidelidad global de la biosíntesis de proteínas como la distinción entre aminoácidos. La interacción entre las aminoacil-tRNA sintetasas y los tRNA ha sido calificada de "segundo código genético", para poner de manifiesto su papel fundamental en el mantenimiento de la precisión de la síntesis proteica. Las reglas de "codificación" son aparentemente más complejas que las del "primer" código.

La **Figura 27–21** resume lo que sabemos sobre los nucleótidos que intervienen en el reconocimiento por algunas aminoacil-tRNA sintetasas. Algunos nucleótidos están conservados en todos los tRNA, por lo que no pueden utilizarse para la discriminación. La presencia de cambios de nucleótidos que alteran la especificidad por el sustrato ha permitido identificar las posiciones de nucleótidos que intervienen en la discriminación por las

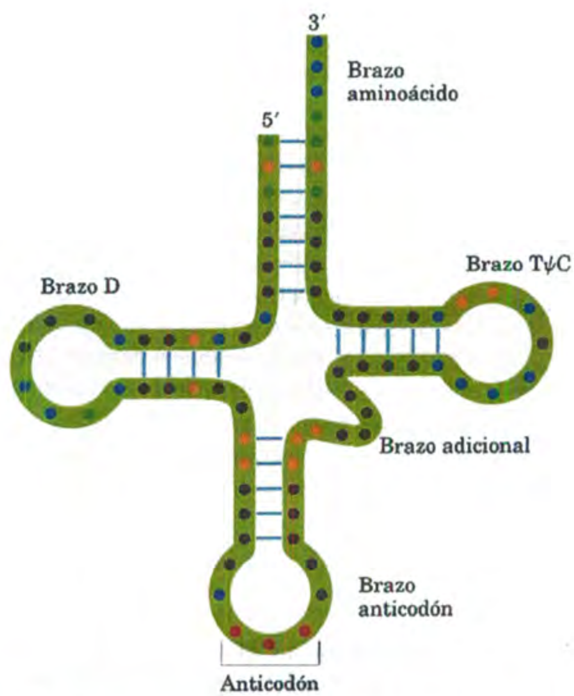


FIGURA 27–21 Posiciones de nucleótidos en los tRNA reconocidas por las aminoacil-tRNA sintetasas. Algunas posiciones (puntos azules) son las mismas en todos los tRNA, por lo que no pueden utilizarse para discriminar uno de otro. Otras posiciones son sitios de reconocimiento conocidos para una (naranja) o más (verde) tRNA sintetasas. Además de la secuencia, hay otros rasgos estructurales que son importantes para el reconocimiento por algunas tRNA sintetasas.

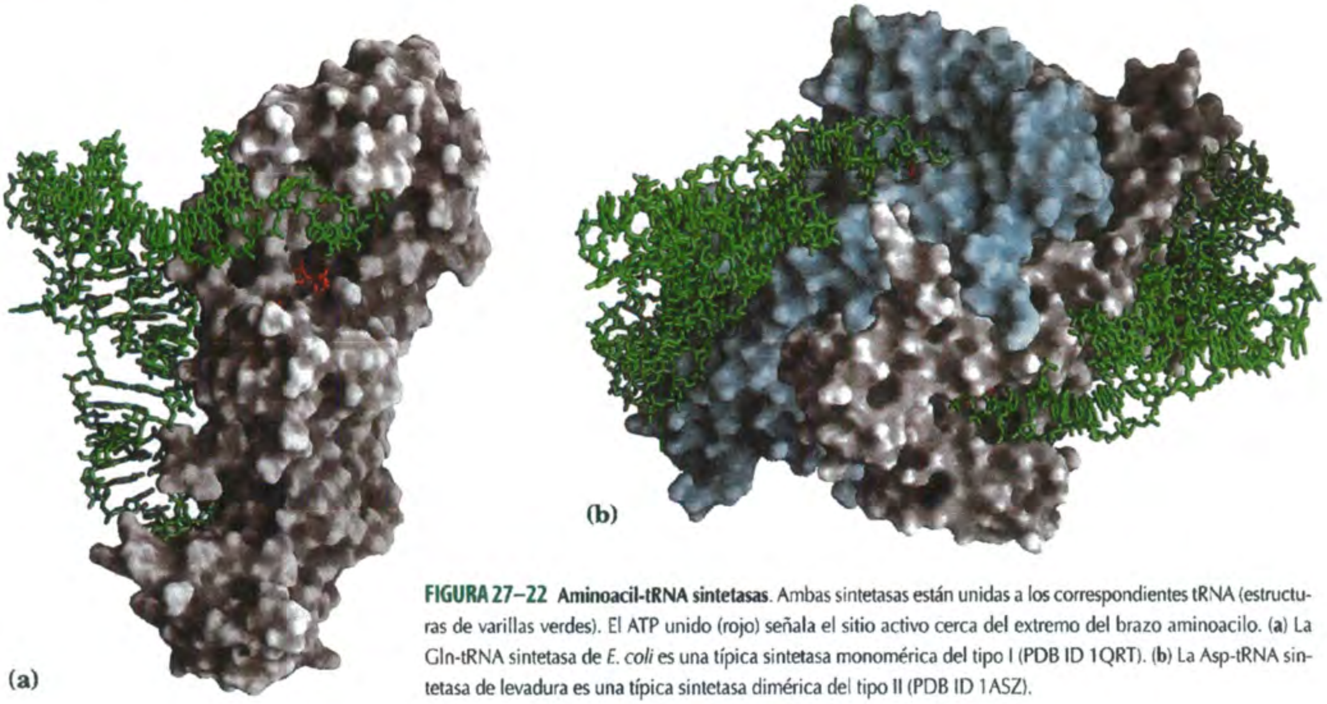


FIGURA 27–22 Aminoacil-tRNA sintetasas. Ambas sintetasas están unidas a los correspondientes tRNA (estructuras de varillas verdes). El ATP unido (rojo) señala el sitio activo cerca del extremo del brazo aminoacilo. **(a)** La Gln-tRNA sintetasa de *E. coli* es una típica sintetasa monomérica del tipo I (PDB ID 1QRT). **(b)** La Asp-tRNA sintetasa de levadura es una típica sintetasa dimérica del tipo II (PDB ID 1ASZ).

aminoacil-tRNA sintetasas. Estas posiciones parecen estar concentradas en los brazos del aminoácido y del anticodón, incluidos los nucleótidos del propio anticodón, pero también se encuentran en otras partes de la molécula de tRNA. La determinación de las estructuras cristalinas de los complejos de las aminoacil-tRNA sintetasas con sus tRNA afines y ATP ha contribuido en gran medida a nuestra compresión de estas interacciones **(Fig. 27–22)**.

Diez o más nucleótidos específicos pueden estar implicados en el reconocimiento de un tRNA por su aminoacil-tRNA sintetasa específica. Sin embargo, en unos pocos casos el mecanismo de reconocimiento es mucho más simple. En una gama de organismos que va de las bacterias al ser humano, el determinante primario del reconocimiento del tRNA por la Ala-tRNA sintetasa es un único par de bases G ═ U en el brazo del aminoácido del $tRNA^{Ala}$ **(Fig. 27–23a)**. Un RNA sintético corto de tan sólo 7 pb dispuestos en una sencilla minihélice en horquilla es aminoacilado eficientemente por la Ala-tRNA sintetasa, siempre que el RNA contenga el par crítico G ═ U (Fig. 27–23b). Este sistema relativamente sencillo de la alanina puede ser una reliquia evolutiva de un período en el que los oligonucleótidos de RNA, antepasados del tRNA, eran aminoacilados en un sistema primitivo de síntesis proteica.

La interacción de las aminoacil-tRNA sintetasas con sus correspondientes tRNA es crítica para la lectura correcta del código genético. La expansión del código para incluir un nuevo aminoácido requeriría necesariamente una nueva pareja aminoacil-tRNA sintetasa:tRNA. En la naturaleza se ha observado una expansión limitada del código genético; en el laboratorio se ha conseguido una expansión más amplia (Recuadro 27–3).

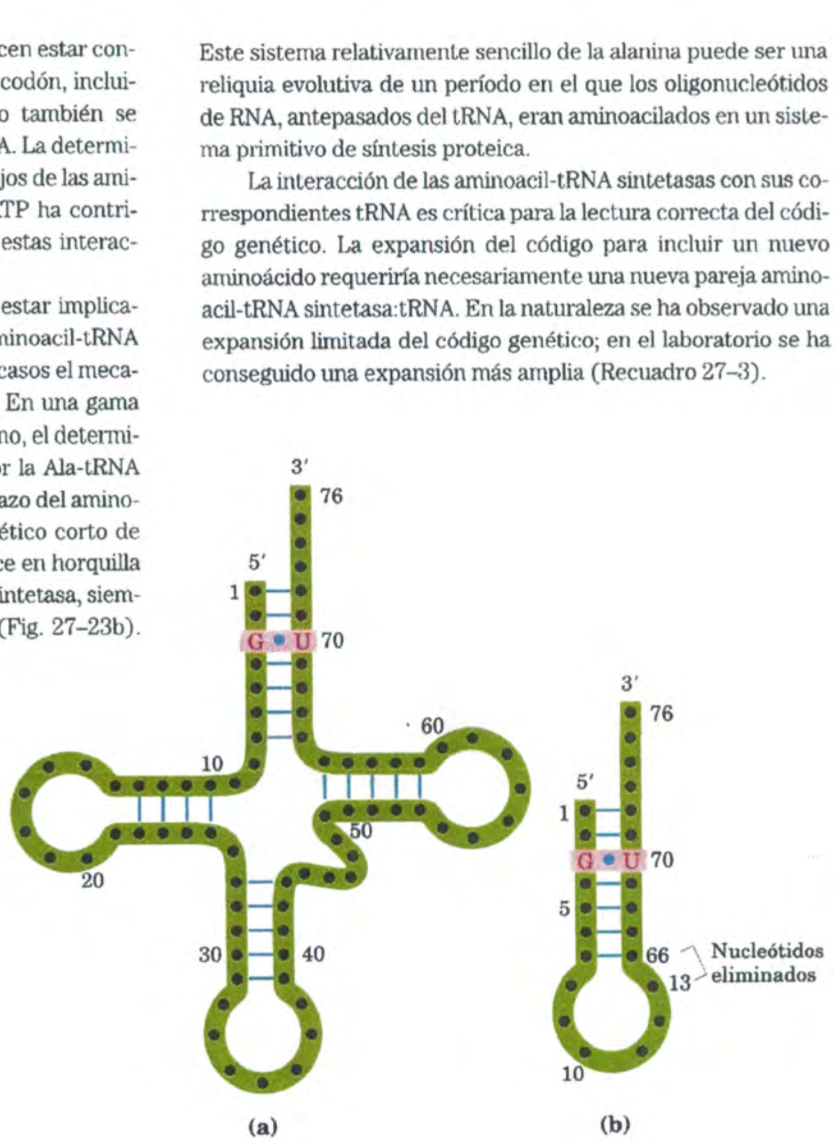


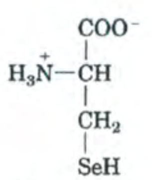
FIGURA 27–23 Elementos estructurales del $tRNA^{Ala}$ requeridos para el reconocimiento por la Ala-tRNA sintetasa. **(a)** Los elementos estructurales del $tRNA^{Ala}$ reconocidos por la Ala-tRNA sintetasa son muy simples. Un solo par de bases G═U (rosa) es el único elemento necesario para la unión específica y la aminoacilación. **(b)** Una corta minihélice sintética de RNA, que contiene el par de bases crítico G═U, pero que carece de la mayor parte de la estructura restante del tRNA, se aminoacila específicamente con alanina casi tan eficientemente como el $tRNA^{Ala}$ completo.

RECUADRO 27-3 Expansión natural y no natural del código genético

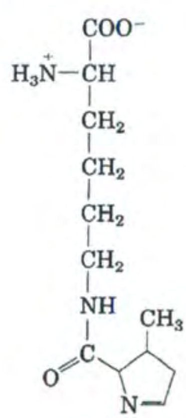
Como hemos visto, los 20 aminoácidos que se encuentran normalmente en las proteínas ofrecen solamente una funcionalidad limitada. Por lo general los sistemas vivos superan estas limitaciones mediante el uso de cofactores enzimáticos o modificando determinados aminoácidos una vez han sido incorporados a las proteínas. En principio, la expansión del código genético para introducir nuevos aminoácidos en las proteínas ofrece otra vía para ampliar la funcionalidad, pero es una vía muy difícil de explorar. Tales cambios pueden fácilmente desembocar en la inactivación de millares de proteínas.

La expansión del código genético para incluir un nuevo aminoácido requiere varios cambios celulares. Una nueva aminoacil-tRNA sintetasa debe estar presente generalmente junto con su correspondiente tRNA. Ambos componentes deben ser altamente específicos, interaccionando solamente entre sí y con el nuevo aminoácido. El nuevo aminoácido debe encontrarse en concentraciones significativas en la célula, lo que puede implicar la evolución de nuevas rutas metabólicas. Como se ha descrito en el Recuadro 27–1, el anticodón del tRNA se aparearía probablemente con un codón que normalmente especifica terminación. Realizar todas estas tareas en una célula viva parece improbable; sin embargo, se ha conseguido, tanto en la naturaleza como en el laboratorio.

En efecto, son 22 y no 20 los aminoácidos especificados por el código genético convencional. Los dos aminoácidos adicionales son la selenocisteína y la pirrolisina, que, aunque se encuentran en unas pocas proteínas, ofrecen una visión de los intrincados detalles de la evolución del código.



Selenocisteína



Pirrolisina

Unas pocas proteínas en todas las células (como la formiato deshidrogenasa en las bacterias y la glutatión peroxidasa en los mamíferos) requieren selenocisteína para su actividad. En *E. coli*, la selenocisteína es introducida en el enzima formiato deshidrogenasa durante la traducción en respuesta a un codón UGA en fase. Un tipo especial de Ser-tRNA, presente a niveles más bajos que otros Ser-tRNA, reconoce el UGA y no otros codones. Este tRNA es cargado con serina por la serina aminoacil-tRNA sintetasa normal, y la serina es convertida enzimáticamente en selenocisteína por un enzima independiente antes de su utilización en el ribosoma. El tRNA cargado no reconoce cualquier codón UGA; alguna señal contextual del mRNA, todavía por identificar, asegura que este tRNA reconozca sólo los pocos codones UGA en ciertos genes que especifican selenocisteína. En efecto, UGA sirve de codón tanto para la terminación como para la selenocisteína (muy raramente). Esta particular expansión del código cuenta con un tRNA específico, como se ha descrito anteriormente, pero carece de la correspondiente aminoacil-tRNA sintetasa. Este proceso es propio de la selenocisteína, pero puede considerarse como un paso intermedio en la evolución de una definición de codones completamente nueva.

La pirrolisina se encuentra en un grupo de arqueobacterias anaeróbicas denominadas metanógenas (véase el Recuadro 22–1). Estos organismos producen metano como un requerimiento de su metabolismo, y el grupo de las metanosarcináceas pueden usar metilaminas como sustrato de la metanogénesis.

La producción de metano a partir de monometilamina requiere el enzima monometilamina metiltransferasa. El gen que codifica este enzima tiene un codón de terminación UAG en el marco de lectura. La estructura de la metiltransferasa fue determinada en 2002 y reveló la presencia del nuevo aminoácido pirrolisina en la posición especificada por el codón UAG. Experimentos posteriores demostraron que, al contrario de la selenocisteína, la pirrolisina se unía directamente a un tRNA especializado por la correspondiente pirrolisil-tRNA sintetasa. Estas células producen pirrolisina a través de una ruta metabólica todavía por descubrir. El sistema en su conjunto tiene todas las características de un sistema de asignación de codones, aunque sólo funciona para codones UAG en este gen particular. Como en el caso de la selenocisteína, probablemente haya señales contextuales que dirijan este tRNA hacia el correcto codón UAG.

¿Es posible emular este logro evolutivo? La modificación de las proteínas con varios grupos funcionales puede suministrar información importante sobre la actividad y la estructura de las proteínas.

Sin embargo, la modificación de las proteínas es a menudo muy laboriosa. Por ejemplo, añadir un nuevo grupo a un residuo Cys en particular implica bloquear de algún modo los otros residuos Cys que estén presentes en la misma proteína. Como alternativa, podría ser mucho más conveniente adaptar el código genético para que la célula pudiera insertar un aminoácido modificado en un determinado lugar de la proteína. Peter Schultz y colaboradores lo han conseguido.

Para desarrollar una nueva asignación para un codón, una vez más se necesitan una nueva aminoacil-tRNA sintetasa y un nuevo tRNA afín, ambos adaptados a trabajar solamente con un nuevo aminoácido determinado. Los esfuerzos para crear esta expansión "no natural" del código genético se centraron inicialmente en *E. coli*. El codón UAG fue elegido como el más adecuado para codificar un nuevo aminoácido. UAG es el menos utilizado de los tres codones de terminación y cepas con tRNA

(continúa en la página siguiente)

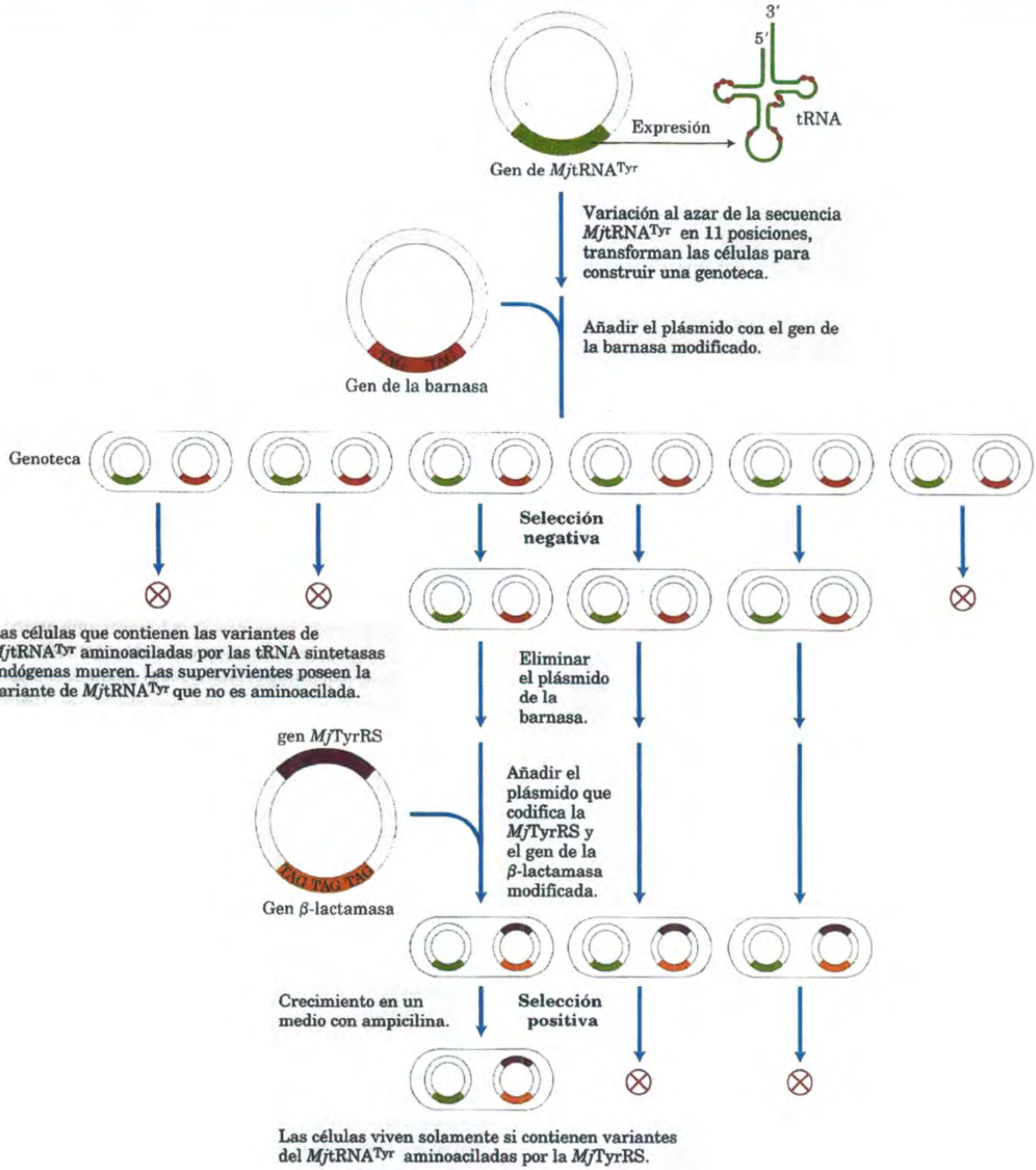


FIGURA 1 Selección de variantes de MjtRNA^{Tyr} que son funcionales solamente con la tirosil tRNA sintetasa MjTyrRS. La secuencia del gen que codifica el MjtRNA^{Tyr} en un plásmido se modifica al azar en 11 posiciones que no interaccionan con la MjTyrRS (puntos rojos). Los plásmidos mutados se introducen en células de *E. coli* para crear una genoteca con millones de variantes del MjtRNA^{Tyr}, representadas por las seis células que aquí se muestran. El gen tóxico de la barnasa, modificado para incluir la secuencia TAG para que su transcrito contenga codones UAG, se suministra en un plásmido aparte y proporciona la selección negativa. Si se expresa este gen, las células mueren. Sólo puede expresarse si la variante del MjtRNA^{Tyr} expresada en esta célula en particular es aminoacilada por aminoacil-tRNA sintetasas endógenas (*E. coli*), que inserten un aminoácido en lugar de detener la traducción. Se modifica también otro gen, que codifica la β-lactamasa, con secuencias TAG que producen codones de terminación UAG. Este gen se suministra en otro plásmido que también expresa el gen que codifica la MjTyrRS; sirve como medio de seleccionar positivamente las restantes variantes del MjtRNA^{Tyr}. Estas variantes, que son aminoaciladas por la MjTyrRS, permiten la expresión del gen de la β-lactamasa, y posibilitan que las células crezcan en ampicilina. Múltiples rondas de selección positiva y negativa suministran las mejores variantes del MjtRNA^{Tyr}, que son aminoaciladas solamente por la MjTyrRS y usadas eficientemente en la traducción.

seleccionados para reconocer UAG (véase el Recuadro 27–4) no muestran defectos en el crecimiento. Para crear el nuevo tRNA y la nueva tRNA sintetasa, se tomaron los genes de un tirosil-tRNA y de la correspondiente tirosil-tRNA sintetasa de la arqueobacteria *Methanococcus jannaschii* (*Mj*tRNA^{Tyr} y *Mj*TyrRS). La *Mj*TyrRS no se une al lazo del anticodón del *Mj*tRNA^{Tyr}, lo que permite modificar el lazo del anticodón para incluir un CUA (el complementario de UAG) sin afectar la interacción.

Puesto que los sistemas de las arqueobacterias y las bacterias son ortólogos, los componentes modificados de las arqueobacterias se pudieron transferir a *E. coli* sin desorganizar el sistema intrínseco de traducción de las células.

En primer lugar, el gen codificante del *Mj*tRNA^{Tyr} tuvo que modificarse para generar un tRNA ideal que no fuese reconocido por ninguna aminoacil-tRNA sintetasa endógena de *E. coli* pero que fuese aminoacilado por la *Mj*TyrRS. Se pudo encontrar esta variante a través de una serie de ciclos de selección positiva y negativa diseñados para el escrutinio de las variantes del gen del tRNA (Fig. 1). Se modificaron al azar determinadas regiones de la secuencia del *Mj*tRNA^{Tyr} y se preparó una genoteca de células que expresaban cada una de ellas una versión diferente de tRNA. Se modificó el gen de la barnasa (una ribonucleasa tóxica para *E. coli*) de manera que su transcrito de mRNA tuviese varios codones UAG, y el gen fue introducido en las células mediante un plásmido. Si la variante del *Mj*tRNA^{Tyr} expresada en una célula determinada era aminoacilada por una tRNA sintetasa endógena, se expresaría la barnasa y la célula moriría (selección negativa). Las células supervivientes contendrían variantes de tRNA que no habrían sido aminoaciladas por las tRNA sintetasas endógenas pero que potencialmente podrían ser aminoaciladas por la *Mj*TyrRS. A continuación se procedió con un protocolo de selección positiva (Fig. 1) mediante la modificación del gen de la β-lactamasa (que confiere resistencia al antibiótico ampicilina), de manera que su transcrito tuviese varios codones UAG. Se introdujo este gen en las células junto con el gen de la *Mj*TyrRS. Las variantes del *Mj*tRNA^{Tyr} que podían ser aminoaciladas por la *Mj*TyrRS permitían el crecimiento en ampicilina sólo si la *Mj*TyrRS también se expresaba en la célula. Varias rondas de selección negativa y positiva permitieron identificar una nueva variante del *Mj*tRNA^{Tyr} que no se veía afectada por enzimas endógenos, era aminoacilada por la *Mj*TyrRS y funcionaba correctamente en la traducción.

Segundo, la *Mj*TyrRS tuvo que modificarse para reconocer el nuevo aminoácido. A continuación, el gen codificante de la *Mj*TyrRS fue mutado para crear una gran genoteca de variantes. Las variantes que aminoacilaban la nueva variante del *Mj*tRNA^{Tyr} con aminoácidos endógenos fueron eliminadas por selección con barnasa.

Se llevó a cabo una segunda ronda de selección positiva (similar a la selección con ampicilina descrita anteriormente), de manera que las células sobrevivieran sólo si la variante del *Mj*tRNA^{Tyr} fuese aminoacilada sólo en presencia del aminoácido no natural. Varias rondas de selección negativa y positiva generaron una pareja de tRNA sintetasa-tRNA afines que reconocía sólo el aminoácido no natural. Estos componentes fueron nombrados de nuevo para indicar que en la selección se había usado un aminoácido no natural.

Esta metodología ha permitido construir muchas cepas de *E. coli* capaces de incorporar un aminoácido no natural en una proteína en respuesta a un codón UAG. Se ha usado la misma aproximación para expandir artificialmente el código genético de las levaduras e incluso de células de mamífero. De esta manera, más de 30 aminoácidos diferentes (Fig. 2) pueden ser introducidos eficientemente y con especificidad de sitio en proteínas clonadas. Estos resultados contribuyen al avance del conocimiento de la estructura y función de las proteínas.

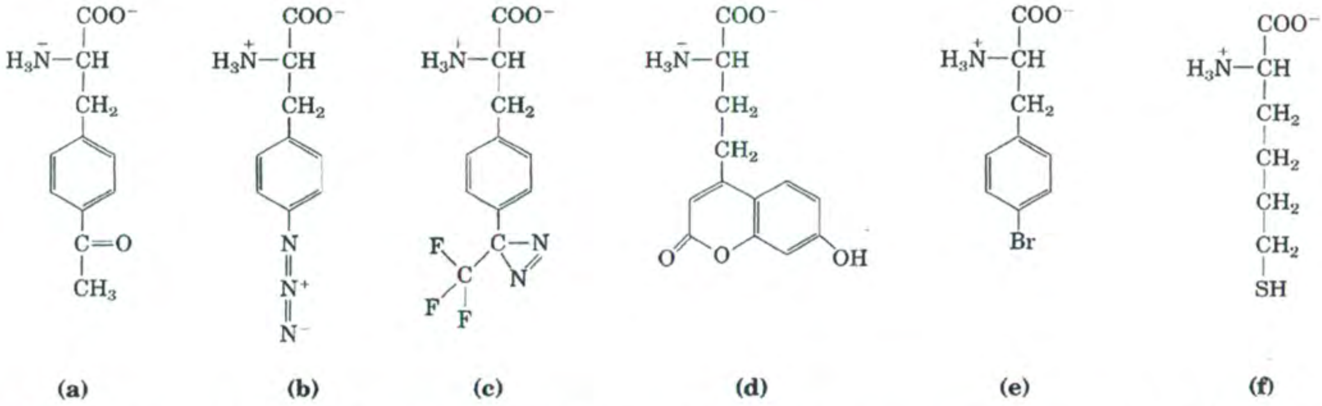


FIGURA 2 Una muestra de aminoácidos no naturales que se han añadido al código genético. Estos aminoácidos no naturales introducen solamente grupos reactivos nuevos, tales como **(a)** una cetona, **(b)** una azida, **(c)** un fotoentrecruzador (un grupo funcional diseñado para formar un enlace covalente con un grupo cercano cuando es activado por la luz), **(d)** un aminoácido muy fluorescente, **(e)** un aminoácido con un átomo pesado (Br) para su uso en cristalografía y **(f)** un análogo de la cisteína de cadena larga que puede formar puentes disulfuro extendidos.

Etapa 2: La síntesis de proteínas empieza con un aminoácido específico

La síntesis de proteínas empieza en el extremo amino-terminal y avanza por adición de sucesivos aminoácidos hacia el extremo carboxilo-terminal del polipéptido en crecimiento, tal como estableció Howard Dintzis en 1961 **(Fig. 27–24)**. El codón de inicio AUG especifica, por tanto, un residuo de metionina *amino-terminal*.

Aunque sólo existe un codón para la metionina, (5′)AUG, todos los organismos contienen dos tRNA para la metionina. Uno de los tRNA se utiliza exclusivamente cuando el (5′)AUG es el codón de inicio para la síntesis proteica. El segundo se utiliza para codificar un residuo metionina en una posición interna de un polipéptido.

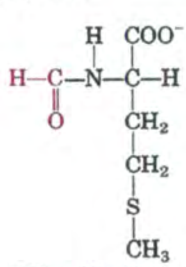
La distinción entre un (5′)AUG de inicio y uno interno es sencilla. En bacterias, los dos tipos diferentes de tRNA específicos para la metionina se designan como $tRNA^{Met}$ y $tRNA^{fMet}$. El residuo aminoácido incorporado de acuerdo con el codón de inicio (5′)AUG es *N*-formilmetionina (fMet). Llega al ribosoma como *N*-formilmetionil-$tRNA^{fMet}$ (fMet-$tRNA^{fMet}$), que se forma en dos reacciones sucesivas. En primer lugar, la metionina es unida al $tRNA^{fMet}$ por la Met-tRNA sintetasa (que en *E. coli* aminoacila tanto el $tRNA^{fMet}$ como el $tRNA^{Met}$):

$$\textbf{Metionina} + \textbf{tRNA}^{\textbf{fMet}} + \textbf{ATP} \longrightarrow \textbf{Met-tRNA}^{\textbf{fMet}} + \textbf{AMP} + \textbf{PP}_i$$

A continuación una transformilasa transfiere un grupo formilo procedente del N^{10}-formiltetrahidrofolato al grupo amino del residuo Met:

$$\boldsymbol{N}^{10}\textbf{-Formiltetrahidrofolato} + \textbf{Met-tRNA}^{\textbf{fMet}} \longrightarrow \textbf{tetrahidrofolato} + \textbf{fMet-tRNA}^{\textbf{fMet}}$$

La transformilasa es más selectiva que la Met-tRNA sintetasa; es específica de residuos Met unidos al $tRNA^{fMet}$, posiblemente porque reconoce algún rasgo estructural único de dicho tRNA. En cambio, Met-$tRNA^{Met}$ inserta la metionina en las posiciones interiores de los polipéptidos.



N-Formilmetionina

La adición del grupo *N*-formilo al grupo amino de la metionina por la transformilasa impide que la fMet se incorpore en las posiciones interiores de los polipéptidos, y a la vez permite que el fMet-$tRNA^{fMet}$ se una a un sitio de inicio específico del ribosoma, que no acepta ni el Met-$tRNA^{Met}$ ni cualquier otro aminoacil-tRNA.

En las células eucarióticas todos los polipéptidos sintetizados por los ribosomas citosólicos empiezan con un residuo Met (en lugar de fMet), pero de nuevo la célula utiliza un tRNA iniciador especializado distinto del $tRNA^{Met}$ utilizado en los codones 5′(AUG) de las posiciones interiores del mRNA. Sin embargo, los polipéptidos sintetizados por los ribosomas de las mitocondrias y los cloroplastos empiezan con *N*-formilmetionina. Este hecho apoya fuertemente la idea de que las mitocondrias y los cloroplastos se originaron a partir de antepasados bacterianos, incorporados de manera simbiótica a las células eucarióticas primitivas en una fase temprana de la evolución (véase la Fig. 1–36).

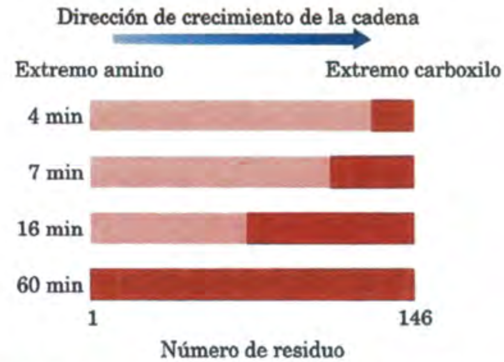


FIGURA 27–24 Demostración de que las cadenas polipeptídicas crecen por adición de nuevos residuos aminoácidos al extremo carboxilo: experimento de Dintzis. Los reticulocitos (eritrocitos inmaduros) sintetizan activamente hemoglobina cuando son incubados con leucina radiactiva (escogida por su abundancia en las cadenas α y β de la globina). Se aislaron cadenas completas de α-globina de los reticulocitos a diferentes tiempos y se estudió la distribución de la radiactividad. Las zonas rojo oscuro muestran las zonas de las cadenas completas de α-globina que contienen residuos de Leu radiactivos. A 4 min, sólo estaban marcados unos pocos residuos en el extremo carboxilo de la α-globina, porque las únicas cadenas de globina *completas* marcadas después de 4 min eran las que casi habían completado su síntesis en el momento de añadir el marcaje. A tiempos de incubación más largos, segmentos cada vez más largos de la cadena polipeptídica contenían residuos marcados, siempre en un bloque en el extremo carboxilo de la cadena. El extremo sin marcar del polipéptido (el extremo amino) se definió de este modo como el extremo de inicio, lo que significa que la cadena polipeptídica crece por adición sucesiva de aminoácidos al extremo carboxilo.

¿Cómo puede un único codón 5′(AUG) distinguir entre la *N*-formilmetionina del principio (o la metionina en el caso de los eucariotas) y los residuos Met interiores? La respuesta se encuentra en los detalles del proceso de inicio.

Las tres etapas del inicio El **inicio** de la síntesis de polipéptidos en las bacterias requiere (1) la subunidad ribosómica 30S, (2) el mRNA que codifica el polipéptido que se ha de sintetizar, (3) el fMet-$tRNA^{fMet}$ iniciador, (4) un conjunto de tres proteínas, denominadas factores de inicio (IF-1, IF-2 e IF-3), (5) GTP, (6) la subunidad ribosómica 50S y (7) Mg^{2+}. La formación del complejo de inicio tiene lugar en tres etapas **(Fig. 27–25)**.

En la etapa ①, la subunidad ribosómica 30S une los factores de inicio IF-1 e IF-3. El factor IF-3 impide que las subunidades 30S y 50S se unan prematuramente. A continuación, el mRNA se une a la subunidad 30S. El iniciador 5′(AUG) es guiado hasta su posición correcta por la **secuencia de Shine-Dalgarno** (nombre que hace referencia a los investigadores australianos John Shine y Lynn Dalgano, quienes la identificaron) del mRNA.

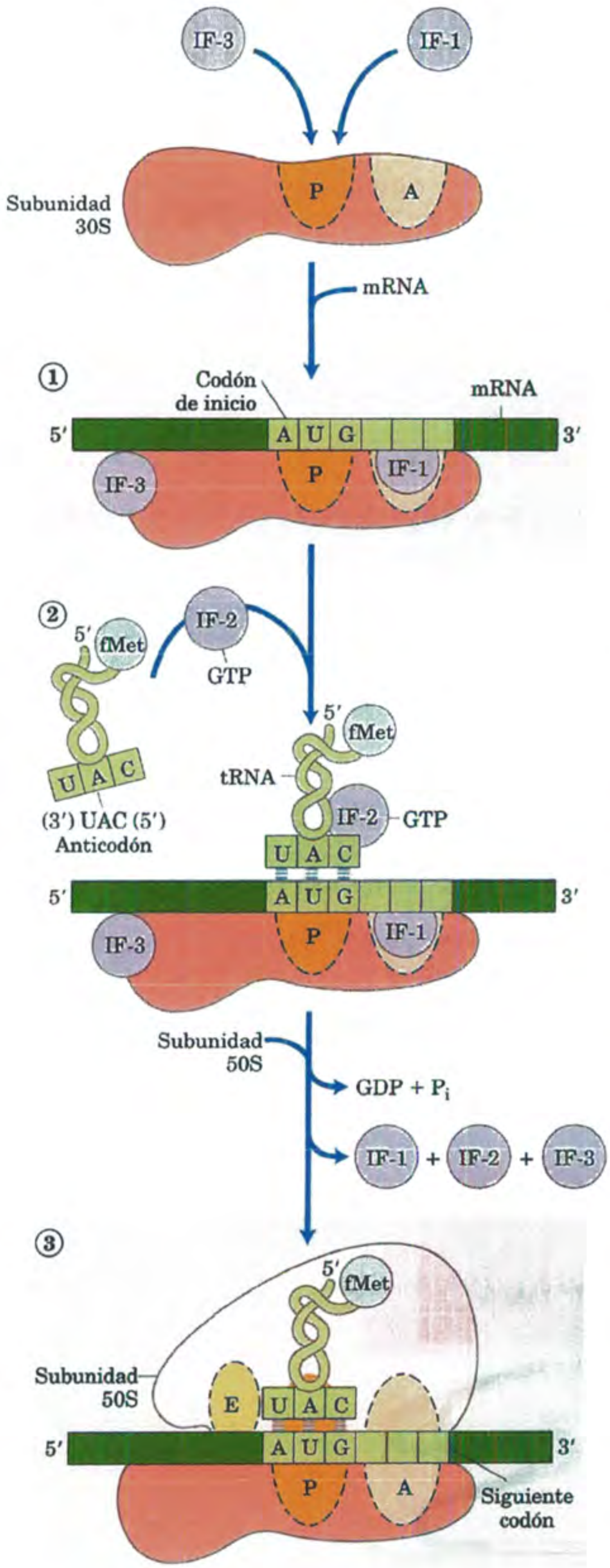


FIGURA 27–25 Formación del complejo de inicio en las bacterias. El complejo se forma en tres pasos (descritos en el texto) a expensas de la hidrólisis del GTP a GDP y P_i. IF-1, IF-2 e IF-3 son factores de inicio. P designa el sitio peptidilo, A el sitio aminoacilo y E el sitio de salida. El anticodón del tRNA está orientado de 3′ a 5′, de izquierda a derecha, como en la Figura 27–8, pero con orientación opuesta a la de las Figuras 27–21 y 27–23.

Esta secuencia consenso es una señal de inicio, de cuatro a nueve residuos purínicos, que se encuentra entre 8 y 13 pb en el lado 5′ del codón de inicio (**Fig. 27–26a**). La secuencia se aparea con una secuencia complementaria rica en pirimidinas cerca del extremo 3′ del rRNA 16S de la subunidad ribosómica 30S (Fig. 27–26b). Esta interacción mRNA-rRNA sitúa la secuencia de inicio (5′)AUG del mRNA en la posición correcta en la subunidad 30S para el inicio de la traducción. El (5′)AUG específico al que debe unirse el fMet-$tRNA^{fMet}$ se distingue de otros codones de metionina por su proximidad a la secuencia Shine-Dalgarno del mRNA.

Los ribosomas bacterianos tienen tres sitios de fijación de tRNA, el **sitio aminoacilo** o **sitio A,** el **sitio peptidilo** o **sitio P** y el sitio de **salida** o **sitio E.** Los sitios A y P unen aminoacil-tRNA, mientras que el sitio E une sólo tRNA no cargados que han completado su tarea en el ribosoma. Tanto la subunidad 30S como la 50S contribuyen a las características de los sitios A y P, mientras que el sitio E se encuentra en su mayor parte confinado en la subunidad 50S. El (5′)AUG iniciador se sitúa en el sitio P, que es el único sitio al que se puede fijar el fMet-$tRNA^{fMet}$ (Fig. 27–25). El fMet-$tRNA^{fMet}$ es el único aminoacil tRNA que se une primero al sitio P; durante la fase de elongación que viene a continuación, todos los aminoacil tRNA entrantes (incluido el Met-$tRNA^{Met}$, que se fija a los AUG interiores) se unen primero al sitio A y sólo a continuación se unen a los sitios P y E. El sitio E es el sitio del que se desprenden los tRNA "descargados" durante la elongación. El factor de inicio IF-1 se une al sitio A, impidiendo la unión del tRNA a este sitio durante el inicio.

En el paso ② del proceso de inicio (Fig. 27–25), tanto el IF-2 unido a GTP como el fMet-$tRNA^{fMet}$ iniciador se unen al complejo formado por la subunidad ribosómica 30S, el IF-3 y el mRNA. El anticodón del tRNA se aparea correctamente con el codón de inicio del mRNA en este paso.

En el paso ③, este gran complejo se une a la subunidad ribosómica 50S; al mismo tiempo, el GTP unido al IF-2 se hidroliza a GDP y P_i, los cuales se desprenden del complejo. Llegados a este punto, los tres factores de inicio abandonan el ribosoma.

Una vez completadas las etapas mostradas en la Fig. 27–25, se obtiene un ribosoma 70S funcional, denominado **complejo de inicio,** que contiene el mRNA y el fMet-$tRNA^{fMet}$ iniciador. La unión correcta del fMet-$tRNA^{fMet}$ al sitio P del complejo de inicio 70S está asegurada por al menos tres puntos de reconocimiento y de unión: la interacción codón-anticodón del AUG iniciador unido al sitio P; la interacción entre la secuencia Shine-Dalgarno del mRNA y el rRNA 16S y las interacciones de unión entre el sitio P del ribosoma y el fMet-$tRNA^{fMet}$. Llegados a este punto, el complejo de inicio ya está preparado para la elongación.

El inicio en las células eucarióticas La traducción en las células eucarióticas es, por lo general, similar a la traducción bacteriana; la mayor parte de las diferencias significativas se encuentran en el mecanismo de inicio. Los mRNA eucarióticos están unidos al ribosoma formando un complejo con un conjunto específico de proteínas de unión. Diversas de estas proteínas se unen a los extremos 5′ y 3′ del mensaje. En el extremo 3′ la proteína de unión a poli(A) (PAB) se une al mRNA. Las células

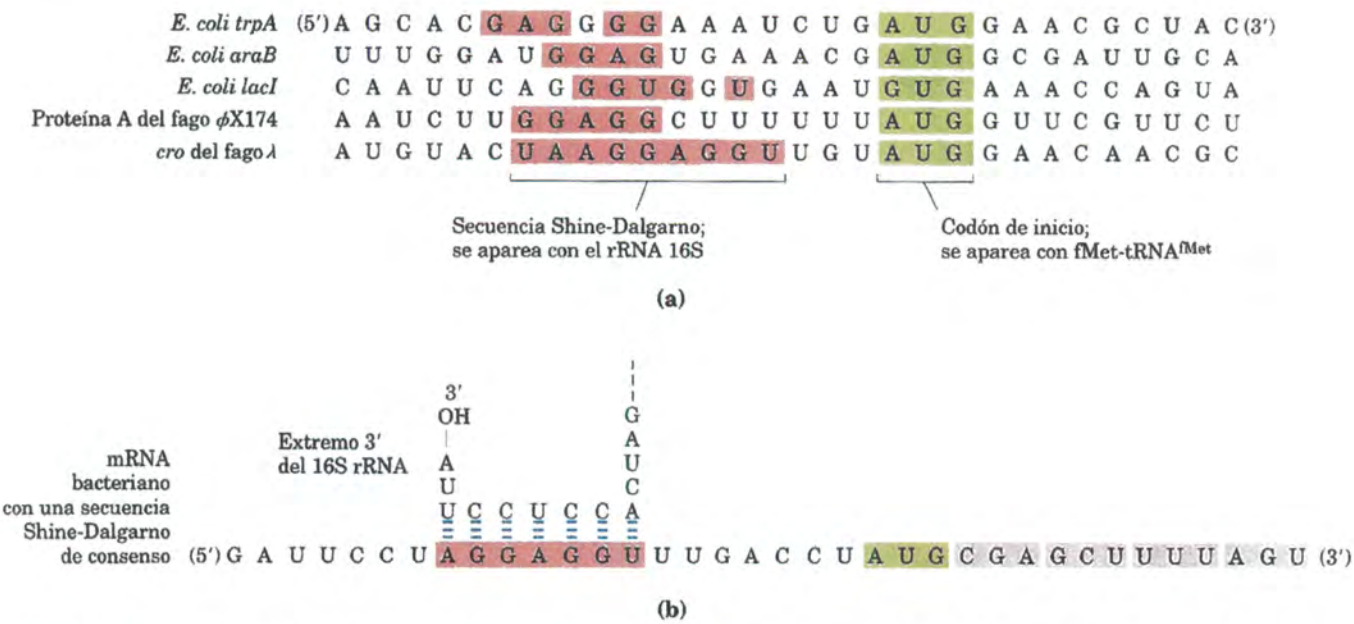


FIGURA 27–26 Secuencias en el RNA mensajero que sirven de señal para el inicio de la síntesis proteica en las bacterias. (a) El alineamiento del AUG de inicio (en verde) en el lugar correcto de la subunidad ribosómica 30S depende en parte de las secuencias Shine-Dalgarno (en rosa) en el lado 5'. Se muestran porciones de los transcritos de mRNA de cinco genes bacterianos. Obsérvese el caso poco usual de la proteína LacI de *E. coli*, que empieza con un codón GUG (Val) (Véase el recuadro 27–1). (b) Las secuencias Shine-Dalgarno del mRNA se aparean con una secuencia cerca del extremo 3' del rRNA 16S.

eucarióticas tienen al menos nueve factores de inicio. Un complejo denominado eIF4F, del que forman parte las proteínas eIF4E, eIF4G y eIF4A, se une al casquete 5' (véase la Fig. 26–13) por medio del eIF4E. La proteína eIF4G se une tanto a la eIF4E como a la PAB, formando un puente entre ambas **(Fig. 27–27)**. La proteína eIF4A tiene actividad RNA helicasa. El complejo eIF4F se asocia con otro factor, el eIF3, y con la subunidad ribosómica 40S. La eficiencia de la traducción depende de diversas propiedades del mRNA así como de las proteínas de este complejo, entre las que se encuentra la longitud del poli(A) en 3' (por lo general, cuanto más largo mejor). La proximidad de los extremos del mRNA eucariótico facilita la regulación de la traducción de la expresión génica, como se discute en el Capítulo 28.

El (5')AUG iniciador es detectado en el mRNA, no por la proximidad a una secuencia del tipo Shine-Dalgarno, sino por barrido del mRNA a partir del extremo 5' hasta encontrar el primer AUG que marca el inicio del marco de lectura. El complejo eIF4F probablemente está implicado en el proceso de barrido, tal vez usando la actividad RNA helicasa del eIF4A para eliminar

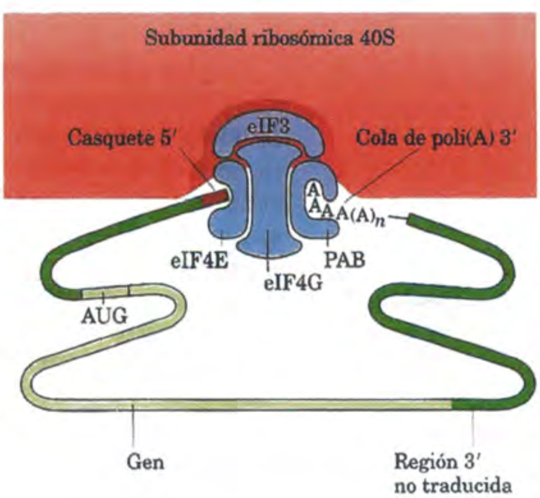


FIGURA 27–27 Complejos proteicos en la formación de un complejo de inicio eucariótico. Los extremos 3' y 5' de los mRNA eucarióticos están unidos por un complejo de proteínas que incluye varios factores de inicio y la proteína de unión a poli(A) (PAB). Los factores eIF4E y eIF4G forman parte de un complejo mayor denominado eIF4F. Este complejo se une a la subunidad ribosómica 40S.

TABLA 27-8 Factores proteicos requeridos para el inicio de la traducción en las bacterias y en las células eucarióticas

Factor	Función
Bacteriano	
IF-1	Evita la unión prematura del tRNA al sitio A
IF-2	Facilita la unión de fMet-$tRNA^{fMet}$ a la subunidad ribosómica 30S
IF-3	Se une a la subunidad ribosómica 30S; impide la asociación prematura de la subunidad 50S; mejora la especificidad del sitio P hacia fMet-$tRNA^{fMet}$
Eucariótico	
eIF2	Facilita la unión del Met-$tRNA^{Met}$ iniciador a la subunidad ribosómica 40S
eIF2B, eIF3	Primeros factores que se unen a la subunidad 40S; facilita los pasos posteriores
eIF4A	La actividad RNA helicasa elimina la estructura secundaria del mRNA para permitir la unión de la subunidad 40S; es parte del complejo eIF4F
eIF4B	Se une al mRNA; facilita el barrido del mRNA para localizar el primer AUG
eIF4E	Se une al casquete 5′ del mRNA; es parte del complejo eIF4F
eIF4G	Se une a eIF4E y a la proteína de unión a poli(A) (PAB); es parte del complejo eIF4F
eIF5	Promueve la disociación de otros factores de inicio de la subunidad 40S como preludio de la asociación de la subunidad 60S para formar el complejo de inicio 80S
eIF6	Facilita la disociación del ribosoma 80S inactivo en subunidades 40S y 60S

la estructura secundaria en la región 5' no traducida del mRNA. El barrido también está facilitado por otra proteína, eIF4B.

Las funciones de los diversos factores de inicio bacterianos y eucarióticos están resumidas en la Tabla 27–8. Los mecanismos de acción de estas proteínas constituyen una importante área de investigación.

Etapa 3: Los enlaces peptídicos se forman durante la fase de elongación

La tercera fase de la síntesis de proteínas es la **elongación.** De nuevo, nuestra discusión se centrará inicialmente en las bacterias. El proceso de elongación requiere (1) el complejo de inicio descrito anteriormente, (2) los aminoacil-tRNA, (3) un conjunto de tres proteínas citosólicas solubles denominadas **factores de elongación** (EF-Tu, EF-Ts y EF-G en las bacterias) y (4) GTP. Para añadir cada residuo aminoácido son necesarios tres pasos, que se repiten tantas veces como residuos deban añadirse.

Paso 1 de la elongación: Unión de un aminoacil-tRNA entrante Durante el primer paso del ciclo de elongación **(Fig. 27–28)**, el aminoacil-tRNA adecuado entrante se fija primeramente a un complejo de EF-Tu que contiene GTP. El complejo resultante aminoacil-tRNA–EF-Tu–GTP se une al sitio A del complejo de inicio 70S. El GTP se hidroliza y se libera un complejo EF–Tu-GDP del ribosoma 70S. El complejo EF-Tu–GTP se regenera en un proceso en que participan EF-Ts y GTP.

Paso 2 de la elongación: Formación del enlace peptídico Se forma a continuación un enlace peptídico entre los dos aminoácidos unidos mediante sus tRNA a los sitios A y P del ribosoma. Ello tiene lugar por transferencia del grupo *N*-formilmetionil iniciador desde su tRNA al grupo amino del segundo aminoácido, que se encuentra ahora en el sitio A **(Fig. 27–29)**. El grupo α-amino del aminoácido en el sitio A actúa de nucleófilo, desplazando el tRNA en el sitio P para formar el enlace peptídico. Esta reacción produce un dipeptidil-tRNA en el sitio A, mientras que el en este momento "descargado" (desacilado) $tRNA^{fMet}$ permanece unido al sitio P. A continuación, los tRNA adoptan un modo de unión híbrido, con elementos de cada uno abarcando dos sitios de unión en el ribosoma, tal como se muestra en la Figura 27–29.

La actividad enzimática que cataliza la formación del enlace peptídico se ha conocido históricamente como **peptidil transferasa** y se suponía que era intrínseca de una o más de las proteínas de la subunidad ribosomal grande. En la actualidad sabemos que esta reacción está catalizada por el rRNA 23S (Fig. 27–13d), función que hay que añadir al repertorio catalítico conocido de los ribozimas. Este descubrimiento tiene interesantes implicaciones para la evolución de la vida (véase el Recuadro 27–2).

Paso 3 de la elongación: Translocación En el último paso del ciclo de elongación, la **translocación,** el ribosoma se desplaza un codón hacia el extremo 3′ del mRNA **(Fig. 27–30a)**. Este movimiento desplaza el anticodón del dipeptidil-tRNA, que está unido todavía al segundo codón del mRNA, desde el sitio A al sitio P y desplaza el tRNA desacilado del sitio P al sitio E, de donde el tRNA es liberado al citosol. El tercer codón del mRNA se encuentra ahora en el sitio A y el segundo codón en el sitio P. El movimiento del ribosoma a lo largo del mRNA requiere EF-G (también denominado translocasa) y la energía proporcionada por la hidrólisis de otra molécula de GTP. Un cambio en la conformación tridimensional global del ribosoma completo hace posible su movimiento a lo largo del mRNA. Puesto que la

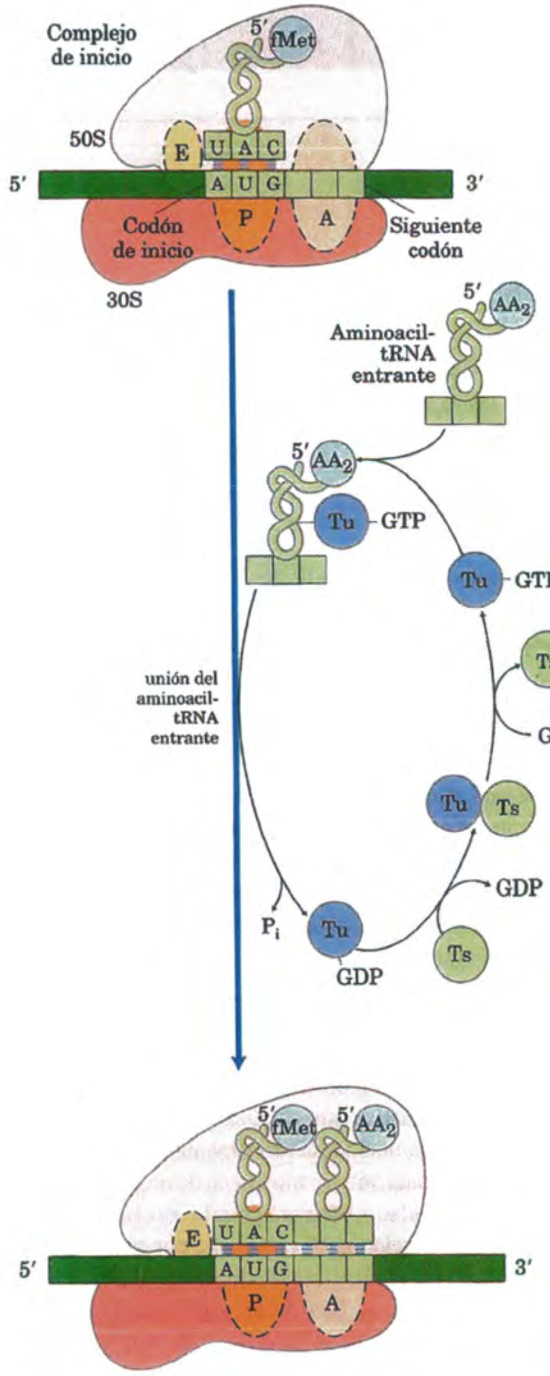


FIGURA 27–28 Primer paso de la elongación en las bacterias: unión del segundo aminoacil-tRNA. El segundo aminoacil-tRNA (AA_2) entra en el sitio A del ribosoma unido a EF-Tu (mostrado como Tu), que también contiene GTP. La unión del segundo aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma va acompañada de la hidrólisis del GTP a GDP y P_i y de la liberación del complejo EF-Tu–GDP del ribosoma. El GDP unido es liberado cuando el complejo EF-Tu–GDP se une a EF-Ts; el EF-Ts es liberado seguidamente cuando otra molécula de GTP se une a EF-Tu. De esta forma se recicla el EF-Tu, que puede repetir el ciclo.

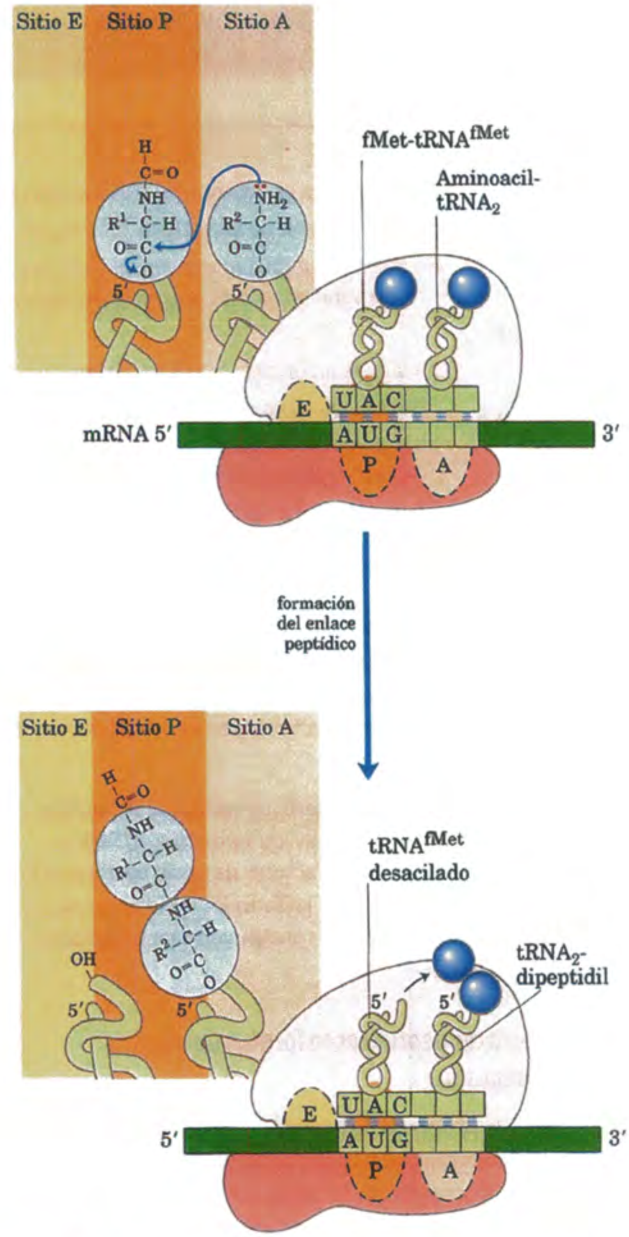
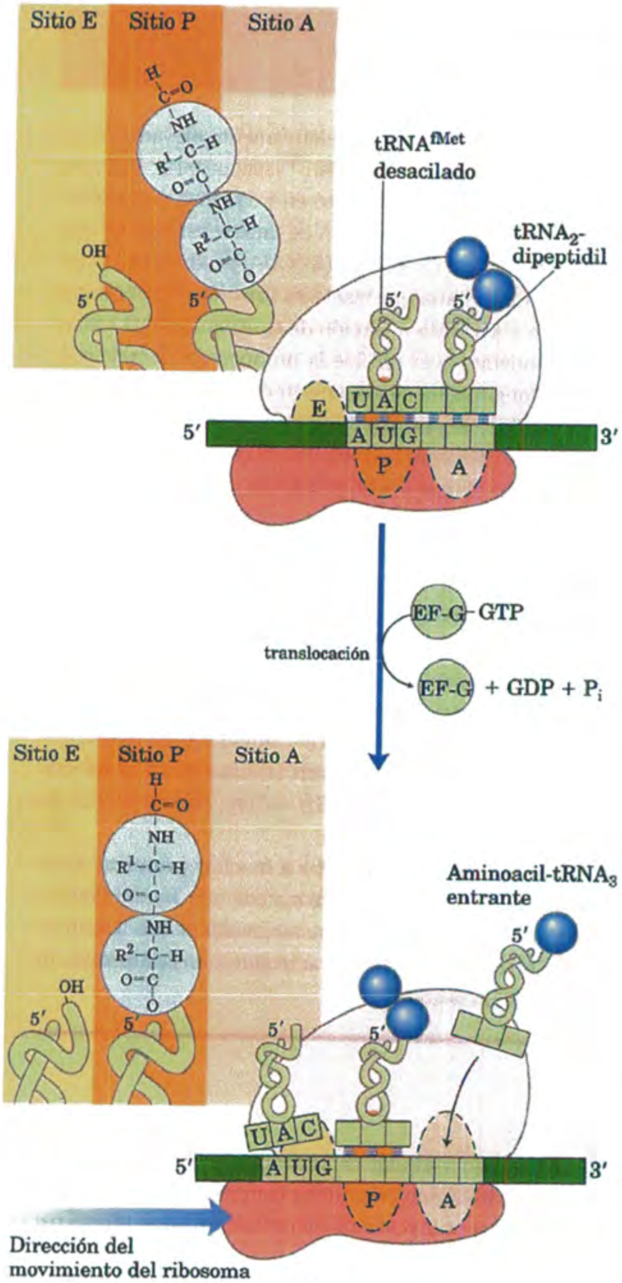


FIGURA 27–29 Segundo paso de la elongación en las bacterias: formación del primer enlace peptídico. La peptidil transferasa que cataliza esta reacción es el ribozima rRNA 23S. El grupo *N*-formilmetionilo se transfiere al grupo amino del segundo aminoacil-tRNA en el sitio A, formando un dipeptidil-tRNA. En este momento, ambos tRNA unidos al ribosoma se desplazan sobre la subunidad 50S para adoptar un estado de unión híbrido. El tRNA no cargado se desplaza de forma que los extremos 3′ y 5′ se encuentran en el sitio E. Análogamente, los extremos 3′ y 5′ del peptidil tRNA se desplazan al sitio P. Los anticodones permanecen en los sitios A y P.

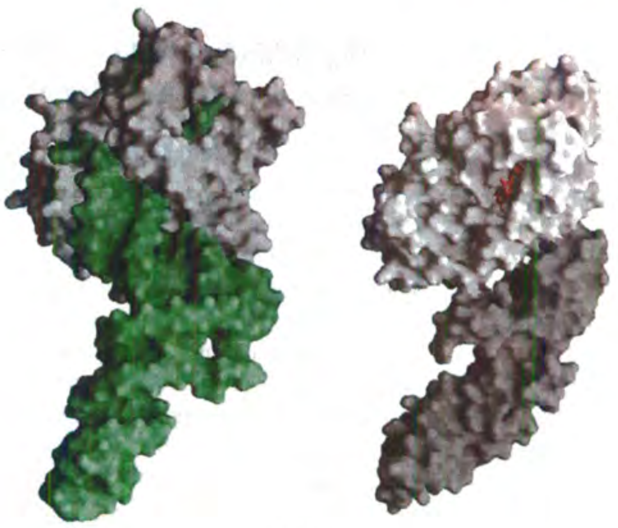
estructura del EF-G es semejante a la estructura del complejo EF-Tu–tRNA (Fig. 27–30b), el EF-G puede unirse al sitio A y posiblemente desplazar al peptidil-tRNA.

Después de la translocación, el ribosoma, con su dipeptidil-tRNA y mRNA unidos, se encuentra disponible para otro ciclo de elongación y para la unión del tercer residuo aminoácido. Este proceso tiene lugar de la misma forma que la adición del segundo residuo (tal como se muestra en las Figs. 27–28, 27–29 y 27–30). Por cada residuo aminoácido correctamente unido al polipéptido en crecimiento, se hidrolizan dos GTP a GDP y P_i, a medida que el ribosoma se desplaza de codón en codón a lo largo del mRNA hacia el extremo 3′.

El polipéptido permanece unido al tRNA del último aminoácido incorporado. Esta asociación mantiene la conexión fun-



(a)



(b)

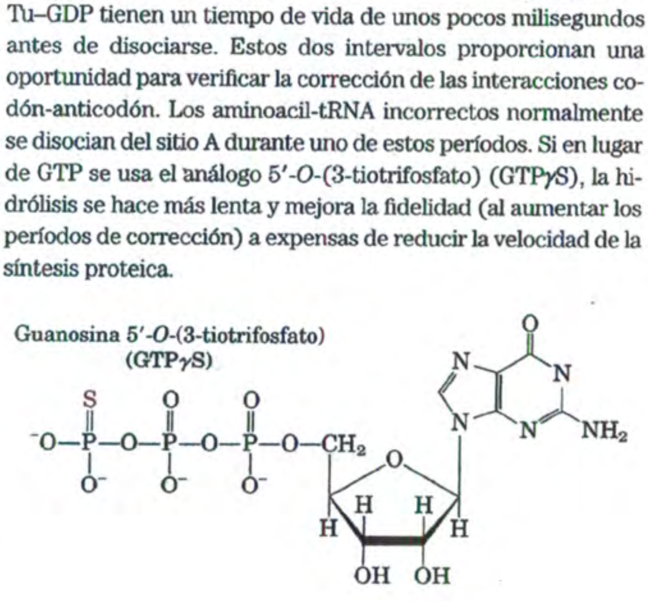
FIGURA 27–30 Tercer paso de la elongación en las bacterias: translocación. **(a)** El ribosoma se traslada un codón hacia el extremo 3′ del mRNA, utilizando la energía proporcionada por la hidrólisis del GTP unido a EF-G (translocasa). El dipeptidil-tRNA se encuentra ahora enteramente en el sitio P, dejando el sitio A libre para el aminoacil-tRNA entrante (el tercero). El tRNA descargado se disocia del sitio E y el ciclo de elongación empieza de nuevo. **(b)** La estructura del EF-G es semejante a la estructura del EF-Tu unido al tRNA. Se muestra (izquierda) el EF-Tu unido al tRNA (verde) (PDB ID 1B23) y (derecha) el EF-G unido al GDP (rojo) (PDB ID 1DAR). La parte carboxilo-terminal del EF-G (gris oscuro) es semejante a la estructura del lazo del anticodón, tanto en forma como en distribución de carga.

cional entre la información en el mRNA y su producto polipeptídico. Al mismo tiempo, el enlace éster entre este tRNA y el extremo carboxilo del polipéptido en crecimiento activa el grupo carboxilo-terminal para el ataque nucleofílico por el aminoácido entrante para formar un nuevo enlace peptídico (Fig. 27–29). Aunque se rompe el enlace éster entre el polipéptido y el tRNA durante la formación del enlace peptídico, el vínculo entre el polipéptido y la información del mRNA se mantiene puesto que cada nuevo aminoácido añadido se encuentra unido a su tRNA.

El ciclo de elongación en los eucariotas es muy similar al de las bacterias. Tres factores de elongación eucarióticos (eEF1α, eEF1$\beta\gamma$ y eEF2) tienen funciones análogas a las de los factores de elongación bacterianos (EF-Tu, EF-Ts y EF-G, respectivamente). Los ribosomas eucarióticos no tienen un sitio E; los tRNA descargados se liberan directamente desde el sitio P.

La corrección de pruebas en el ribosoma La actividad GTPasa del EF-Tu durante el primer paso de la elongación en las células bacterianas (Fig. 27–28) contribuye de forma sustancial a la velocidad y fidelidad del proceso biosintético en su conjunto. Tanto el complejo EF-Tu–GTP como el complejo EF-Tu–GDP tienen un tiempo de vida de unos pocos milisegundos antes de disociarse. Estos dos intervalos proporcionan una oportunidad para verificar la corrección de las interacciones codón-anticodón. Los aminoacil-tRNA incorrectos normalmente se disocian del sitio A durante uno de estos períodos. Si en lugar de GTP se usa el análogo 5′-*O*-(3-tiotrifosfato) (GTPγS), la hidrólisis se hace más lenta y mejora la fidelidad (al aumentar los períodos de corrección) a expensas de reducir la velocidad de la síntesis proteica.

Guanosina 5′-*O*-(3-tiotrifosfato)
(GTPγS)



RECUADRO 27–4 Variación inducida en el código genético: supresión de mutaciones sin sentido

Cuando una mutación introduce un codón de terminación en el interior de un gen, la traducción se detiene prematuramente y la cadena polipeptídica incompleta es a menudo inactiva. Tales mutaciones se denominan mutaciones sin sentido. La función normal del gen puede ser restablecida si una segunda mutación o bien (1) convierte el codón de terminación mal colocado en un codón que especifique un aminoácido o bien (2) suprime los efectos del codón de terminación. Tales mutaciones restauradoras se denominan **supresores sin sentido**; generalmente se trata de mutaciones en los genes del tRNA que producen tRNA alterados (supresores) que pueden reconocer el codón de terminación insertando un aminoácido en esta posición. La mayoría de los tRNA supresores tienen sustituciones de una sola base en sus anticodones.

Los tRNA supresores constituyen una variación inducida experimentalmente del código genético para permitir la lectura de codones que normalmente son de terminación, similar a las variaciones naturales del código descritas en el Recuadro 27–1. La supresión de mutaciones sin sentido no destruye completamente la transferencia de información en la célula, porque por lo general en las células hay varias copias de cada gen de tRNA; algunos de estos genes duplicados se expresan débilmente y sólo son responsables de una pequeña parte del tRNA disponible en la célula. Las mutaciones supresoras afectan habitualmente a estas especies de tRNA "minoritarias", dejando que el tRNA mayoritario lea su codón normalmente.

Por ejemplo, en *E. coli* hay tres genes idénticos para el $tRNA^{Tyr}$, que producen un tRNA con el anticodón (5′)GUA. Uno de ellos se expresa en cantidades relativamente elevadas y, por tanto, representa la especie de $tRNA^{Tyr}$ mayoritaria; los otros dos genes se transcriben solamente en pequeñas cantidades. Un cambio en el anticodón del tRNA de uno de estos genes duplicados de $tRNA^{Tyr}$, de (5′)GUA a (5′)CUA, produce una especie de $tRNA^{Tyr}$ minoritaria que insertará tirosina en los codones de terminación UAG. Esta inserción de tirosina en UAG es ineficiente, pero puede hacer posible la producción de suficiente proteína de la longitud adecuada a partir de un gen con una mutación sin sentido, que permita la supervivencia de la célula. El $tRNA^{Tyr}$ mayoritario continúa traduciendo el código genético de forma normal para la mayoría de proteínas.

La mutación que conduce a la creación de un tRNA supresor no ocurre siempre en el anticodón. La supresión de los codones UGA sin sentido implica generalmente al $tRNA^{Trp}$, que normalmente reconoce UGG. La alteración que le permite leer UGA (e insertar residuos de Trp en estas posiciones) es un cambio G $\rightarrow$ A en la posición 24 (en un brazo del tRNA algo separado del anticodón), que altera el tRNA de modo que pueda reconocer *tanto* UGG *como* UGA. Un cambio similar se encuentra en los tRNA que intervienen en la variación natural más común del código genético (UGA = Trp; véase el Recuadro 27–1).

La supresión debería dar lugar a muchas proteínas anormalmente largas, pero no siempre sucede así. Todavía no entendemos muchos de los procesos moleculares que tienen lugar durante la terminación de la traducción y en la supresión de las mutaciones sin sentido.

El proceso de la síntesis de proteínas (incluidas las características del apareamiento codón-anticodón ya descritas) ha sido claramente optimizado a lo largo de la evolución para equilibrar los requerimientos de velocidad y fidelidad. Una mejora en la fidelidad podría disminuir la velocidad, mientras que el aumento en la velocidad probablemente sacrificaría la fidelidad. Recuerde que el mecanismo de corrección de pruebas del ribosoma solamente revisa que se haya producido el correcto apareamiento codón-anticodón. La identidad de los aminoácidos unidos a los tRNA no es revisada en el ribosoma. Si un tRNA está aminoacilado con un aminoácido incorrecto (tal como puede hacerse experimentalmente), éste será incorporado sin impedimento alguno a la proteína, de acuerdo con el codón normalmente reconocido por el tRNA.

Etapa 4: La terminación de la síntesis de polipéptidos requiere una señal específica

La elongación continúa hasta que el ribosoma añade el último aminoácido codificado por el mRNA. La **terminación,** cuarta fase de la síntesis de polipéptidos, está señalada por la presencia de uno de los tres codones de terminación del mRNA (UAA, UAG, UGA), situado inmediatamente después del codón del último aminoácido codificado. Las mutaciones en el anticodón del tRNA que causan la inserción de un aminoácido en un codón de terminación son generalmente deletéreas para la célula (Recuadro 27–4).

En las bacterias, cuando un codón de terminación ocupa el sitio A, tres **factores de terminación** o **factores de liberación,** las proteínas RF-1, RF-2 y RF-3, contribuyen a (1) la hidrólisis del enlace peptidil-tRNA terminal; (2) la liberación del polipéptido y del último tRNA , ya descargado, del sitio P, y (3) la disociación del ribosoma 70S en sus subunidades 30S y 50S, de nuevo disponibles para iniciar un nuevo ciclo de síntesis proteica **(Fig. 27–31).** El RF-1 reconoce los codones de terminación UAG y UAA y el RF-2 reconoce UGA y UAA. Tanto RF-1 como RF-2 (según qué codón esté presente) se unen a un codón de terminación y hacen que la peptidil transferasa transfiera la cadena polipeptídica en crecimiento a una molécula de agua en lugar de a otro aminoácido. Estos factores de liberación poseen dominios que aparentemente mimetizan la estructura del tRNA, tal como se muestra para el factor de elongación EF-G en la Figura 27–30b. No se ha establecido con claridad la función específica del RF-3, aunque se supone que libera la subunidad ribosómica. En los eucariotas, un solo factor de liberación, denominado eRF, reconoce los tres codones de terminación.

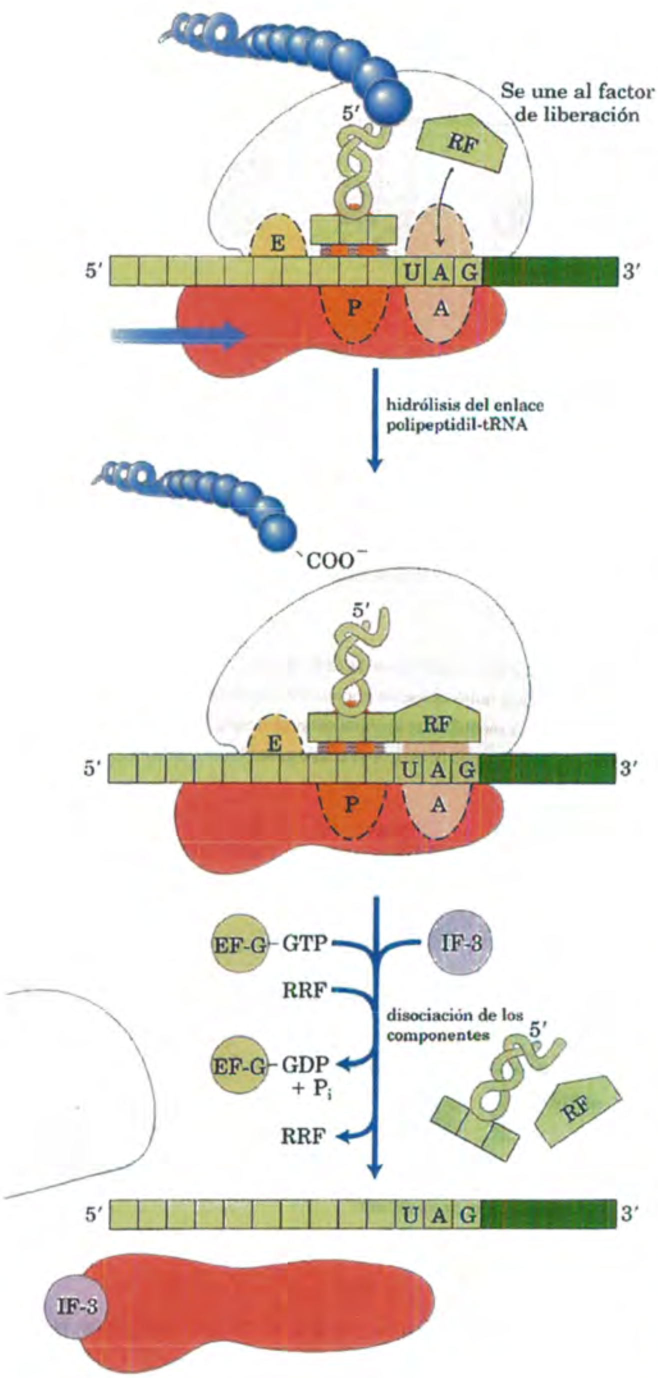


FIGURA 27–31 Terminación de la síntesis de proteínas en las bacterias. La terminación ocurre en respuesta a un codón de terminación en el sitio A. En primer lugar, un factor de liberación, RF, se une al sitio A (RF-1 o RF-2 según qué codón de terminación esté presente). A continuación se produce la hidrólisis del enlace éster entre el polipéptido en crecimiento y el tRNA en el sitio P y se libera el polipéptido terminado. Finalmente el mRNA, el tRNA desacilado y el factor de liberación abandonan el ribosoma, el cual se disocia en sus subunidades 30S y 50S, ayudado por el factor de reciclaje ribosómico (RRF), IF-3 y la energía suministrada por la hidrólisis de GTP mediada por EF-G. El complejo de la subunidad 30S con IF-3 está listo para empezar un nuevo ciclo de traducción (véase la Fig. 27–25).

El reciclaje de los ribosomas está asociado a la disociación de los componentes de la traducción. Los factores de liberación se disocian del complejo posterminación (con un tRNA no cargado en el sitio P) y son reemplazados por EF-G y una proteína denominada factor de reciclaje de ribosomas (RRF; M_r 20.300). La hidrólisis de GTP por EF-G provoca la disociación de la subunidad 50S del complejo 30S tRNA-mRNA. EGF y RRF son reemplazados por IF-3, que promueve la disociación del tRNA. El mRNA se disocia a continuación. El complejo de IF-3 con la subunidad 30S están entonces en disposición de iniciar otra ronda de síntesis proteica (Fig. 27–25).

Coste energético de la fidelidad de la síntesis proteica La síntesis de una proteína que represente fielmente la información especificada por su mRNA requiere energía. La formación de cada aminoacil-tRNA utiliza dos grupos fosfato de alta energía. Se consume un ATP adicional cada vez que un aminoácido activado de manera incorrecta es hidrolizado por la actividad desacilante de una aminoacil-tRNA sintetasa, como parte de su actividad correctora de pruebas. Durante el primer paso de la elongación se escinde una molécula de GTP en GDP y P_i y otra durante la translocación. Por tanto, de promedio, para la formación de cada uno de los enlaces peptídicos de un polipéptido se requiere la energía derivada de la hidrólisis de más de cuatro NTP a NDP y P_i.

Esto representa un "impulso" termodinámico sumamente grande en la dirección de la síntesis: se requieren al menos $4 \times 30{,}5$ kJ/mol = 122 kJ/mol de energía de enlace fosfodiéster para generar un enlace peptídico, que tiene una energía libre estándar de hidrólisis de sólo unos −21 kJ/mol. El cambio neto de energía libre en la síntesis del enlace peptídico es, por tanto, de −101 kJ/mol. Las proteínas son polímeros que contienen información. El objetivo bioquímico no es simplemente la formación de un enlace peptídico, sino la formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos *especificados*. Cada uno de los compuestos fosfato de alta energía gastados en este proceso juega un papel determinante en el mantenimiento del alineamiento correcto entre cada nuevo codón del mRNA y su correspondiente aminoácido codificado en el extremo en crecimiento del polipéptido. Esta energía hace posible una gran fidelidad en la traducción biológica del mensaje genético del mRNA a la secuencia de aminoácidos de las proteínas.

Traducción rápida de un mensajero individual por los polisomas Se pueden aislar grandes agrupamientos de 10 a 100 ribosomas, muy activos en la síntesis proteica, tanto de las células eucarióticas como de las bacterianas. Las micrografías electrónicas muestran una fibra entre los ribosomas adyacentes de los agrupamientos, denominados **polisomas (Fig. 27–32)**. La hebra conectora es una molécula única de mRNA que es traducida simultáneamente por muchos ribosomas próximos unos a otros, hecho que permite una utilización muy eficiente del mRNA.

En las bacterias la transcripción y la traducción están estrechamente acopladas. Los RNA mensajeros se sintetizan y se traducen en la misma dirección 5'→3'. Los ribosomas empiezan

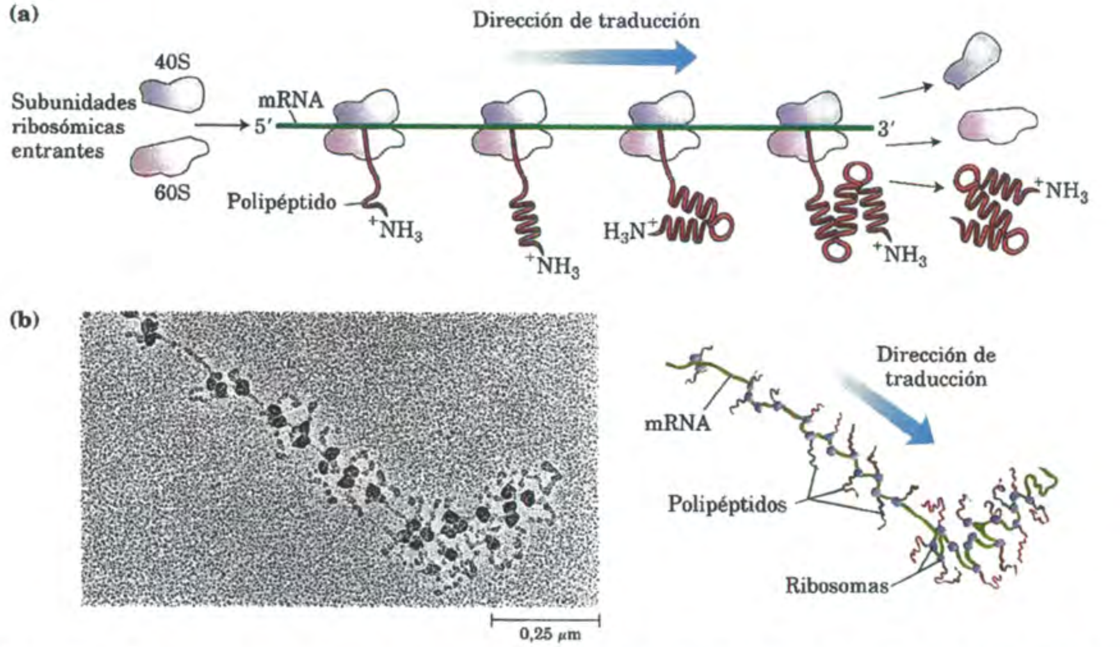


FIGURA 27–32 Un polisoma. (a) Se muestran cuatro ribosomas traduciendo simultáneamente una molécula de mRNA eucariótico desplazándose desde el extremo 5′ al 3′ y sintetizando un polipéptido desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal. (b) Micrografía electrónica y diagrama explicativo de un polisoma de la glándula de la seda de una larva de gusano de seda. El mRNA se traduce simultáneamente por muchos ribosomas. Las cadenas del polipéptido crecen a medida que los ribosomas se desplazan hacia el extremo 3′ del mRNA. El producto final de este proceso es la fibroína de la seda.

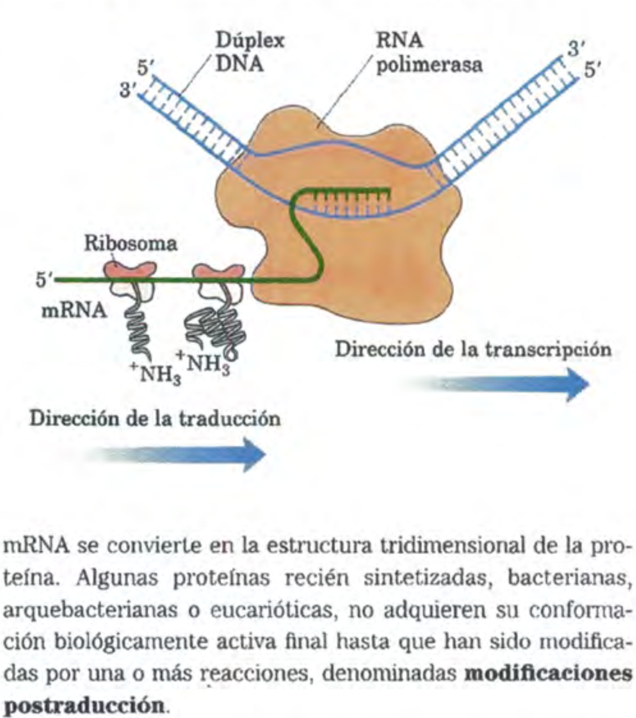


FIGURA 27–33 Acoplamiento de la transcripción y la traducción en las bacterias. El mRNA es traducido por los ribosomas cuando todavía está siendo transcrito a partir del DNA por la RNA polimerasa. Ello es posible porque el mRNA en las bacterias no ha de ser transportado desde el núcleo al citoplasma para encontrarse con los ribosomas. En este diagrama esquemático los ribosomas están representados con un tamaño menor que la RNA polimerasa. En realidad, los ribosomas (M_r 2,7 × 10^6) son un orden de magnitud mayores que la RNA polimerasa (M_r 3,9 × 10^5).

a traducir el extremo 5′ del mRNA antes de que se haya completado la transcripción **(Fig. 27–33).** La situación es completamente diferente en los eucariotas, en los que los mRNA recién transcritos tienen que ser transferidos fuera del núcleo antes de ser traducidos.

Los mRNA bacterianos generalmente tienen una existencia de sólo unos pocos minutos (p. 1049) antes de ser degradados por nucleasas. Para mantener elevadas tasas de síntesis de proteínas, el mRNA de una proteína determinada, o de un conjunto de proteínas, tiene que producirse continuamente y ser traducido con la máxima eficiencia. La corta vida de los mRNA en las bacterias permite que la síntesis de una proteína cese rápidamente cuando ya no es necesaria para la célula.

Etapa 5: Plegamiento y maduración de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas

En la última fase de la síntesis de proteínas, la cadena polipeptídica naciente se pliega y se modifica para adquirir su forma biológicamente activa. Durante o después de su síntesis, el polipéptido adquiere progresivamente su conformación nativa, con la formación de los puentes de hidrógeno y las interacciones de van der Waals, iónicas e hidrofóbicas apropiadas. De esta manera, el mensaje genético, lineal o unidimensional, del mRNA se convierte en la estructura tridimensional de la proteína. Algunas proteínas recién sintetizadas, bacterianas, arquebacterianas o eucarióticas, no adquieren su conformación biológicamente activa final hasta que han sido modificadas por una o más reacciones, denominadas **modificaciones postraducción**.

Modificaciones amino-terminales y carboxilo-terminales El primer residuo insertado en todos los polipéptidos es *N*-formilmetionina (en las bacterias) o metionina (en los eucariotas). Sin embargo, el grupo formilo, el residuo Met amino-terminal y, a menudo, otros residuos amino-terminales (y, en algunos casos, carboxilo-terminales) pueden ser eliminados enzimáticamente en la elaboración de la proteína funcional final. En hasta el 50% de las proteínas eucarióticas, el grupo amino del residuo amino-terminal es *N*-acetilado después de la traducción. Los residuos carboxilo-terminales a veces también son modificados.

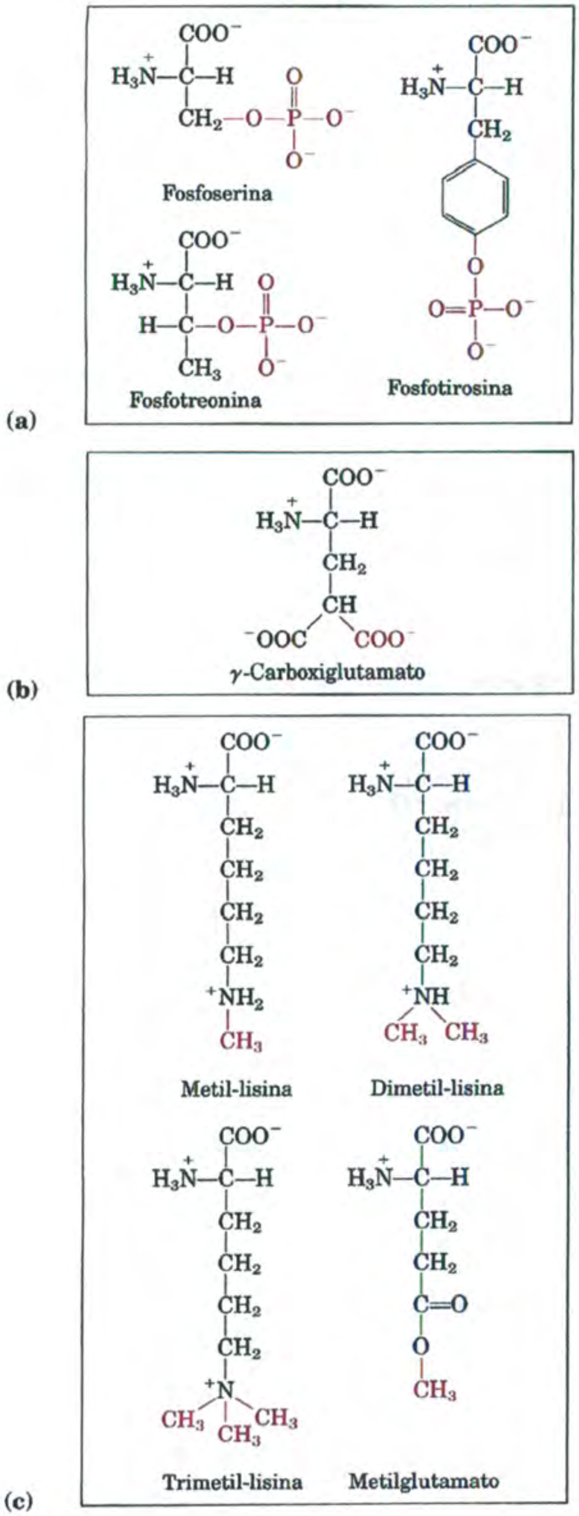


FIGURA 27–34 Algunos residuos aminoácidos modificados. (a) Aminoácidos fosforilados. **(b)** Un aminoácido carboxilado. **(c)** Algunos aminoácidos metilados.

Pérdida de secuencias señal Como veremos en la Sección 27.3, los 15 a 30 residuos en el extremo amino-terminal de algunas proteínas juegan un papel en dirigir la proteína a su destino final en la célula. Estas **secuencias señal** son finalmente eliminadas mediante peptidasas específicas.

Modificación de aminoácidos concretos Los grupos hidroxilo de ciertos residuos Ser, Thr y Tyr de algunas proteínas son fosforilados enzimáticamente por ATP **(Fig. 27–34a)**; los grupos fosfato añaden cargas negativas a estos polipéptidos. El significado funcional de esta modificación depende de la proteína. Por ejemplo, la caseína de la leche tiene muchos grupos fosfoserina que fijan Ca^{2+}. El calcio, el fosfato y los aminoácidos son nutrientes esenciales para los lactantes; así pues, la caseína proporciona tres nutrientes esenciales. Como hemos visto en numerosas ocasiones, los ciclos de fosforilación–desfosforilación regulan la actividad de muchos enzimas y proteínas reguladoras.

Se pueden añadir grupos carboxilo adicionales a los residuos de Glu de algunas proteínas. Por ejemplo, la protrombina, proteína de la coagulación de la sangre, contiene varios residuos γ-carboxiglutamato (Fig. 27–34b) en su región amino-terminal, introducidos por un enzima que requiere vitamina K. Estos grupos carboxilo fijan Ca^{2+}, que es necesario para iniciar el mecanismo de coagulación.

Existen residuos monometil- y dimetil-lisina (Fig. 27–34c) en algunas proteínas musculares y en el citocromo *c*. La calmodulina de la mayoría de organismos contiene un residuo de trimetil-lisina en una posición específica. En otras proteínas, la metilación de los grupos carboxilo de algunos residuos Glu elimina su carga negativa.

Unión de cadenas laterales de glúcidos Las cadenas laterales de glúcidos de las glucoproteínas se unen covalentemente durante o después de la síntesis del polipéptido. En algunas glucoproteínas, la cadena lateral de glúcido se une enzimáticamente a residuos Asn (oligosacáridos unidos por enlace *N*), en otras a residuos Ser o Thr (oligosacáridos unido por enlace *O*) (véase la Fig. 7–29). Muchas proteínas que funcionan extracelularmente, al igual que los proteoglucanos lubricantes que revisten las membranas mucosas, contienen cadenas laterales de oligosacáridos (véase la Fig. 7–27).

Adición de grupos isoprenilo Diversas proteínas eucarióticas están modificadas con grupos derivados del isopreno (grupos isoprenilo). Se forma un enlace tioéter entre el grupo isoprenilo y un residuo Cys de la proteína (véase la Fig. 11–14). Los grupos isoprenilo proceden de intermedios pirofosforilados de la ruta biosintética del colesterol (véase la Fig. 21–35), tales como el farnesil pirofosfato **(Fig. 27–35)**. Entre las proteínas

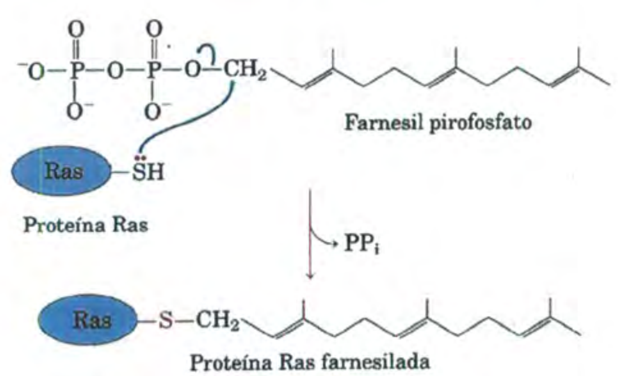


FIGURA 27–35 Farnesilación de un residuo Cys. El enlace tioéter se muestra en rojo. La proteína Ras es el producto del oncogén *ras*.

modificadas de esta forma se cuentan las proteínas Ras, productos de los oncogenes y protooncogenes *ras*, y las proteínas G (ambas discutidas en el Capítulo 12) y las laminas, que se encuentran en la matriz nuclear. El grupo isoprenilo sirve para anclar la proteína en una membrana. La actividad transformadora (carcinogénica) del oncogén *ras* se pierde cuando se bloquea la isoprenilación de la proteína Ras, hecho que ha estimulado el interés por la búsqueda de inhibidores de esta ruta de modificación postraducción para su utilización en la quimioterapia del cáncer.

Adición de grupos prostéticos Muchas proteínas requieren para su actividad grupos prostéticos unidos covalentemente. Dos ejemplos evidentes de ello son la molécula de biotina de la acetil-CoA carboxilasa y el grupo hemo de la hemoglobina o del citocromo *c*.

Modificación proteolítica Muchas proteínas se sintetizan inicialmente como grandes polipéptidos precursores inactivos, que son recortados proteolíticamente para dar sus formas activas, más pequeñas. Algunos ejemplos son la insulina, algunas proteínas víricas y proteasas tales como el quimotripsinógeno y el tripsinógeno (véase la Fig. 6–38).

Formación de puentes disulfuro Algunas proteínas, después de plegarse en su conformación nativa, forman puentes disulfuro inter- o intracatenarios entre residuos Cys. Los puentes disulfuro son comunes en las proteínas eucarióticas destinadas a la exportación. Los entrecruzamientos formados de este modo ayudan a proteger la conformación nativa de la molécula de proteína de la desnaturalización en el medio extracelular, que puede diferir significativamente de las condiciones intracelulares y es generalmente oxidante.

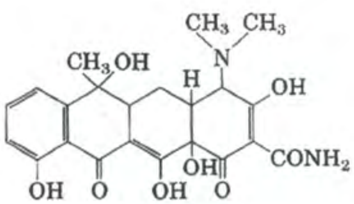
La síntesis de proteínas es inhibida por muchos antibióticos y toxinas

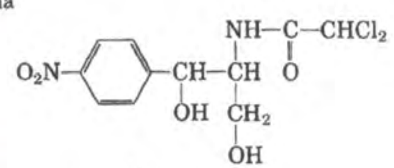
La síntesis de proteínas es una función central en la fisiología celular y es una de las principales dianas de muchos antibióticos y toxinas naturales. Excepto en los casos especificados, estos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas en las bacterias. Las diferencias entre la síntesis de proteínas bacteriana y eucariótica, aunque a veces sean mínimas, son suficientes para que la mayoría de los compuestos que se discuten a continuación sean relativamente inocuos para las células eucarióticas. La selección natural ha favorecido la evolución de compuestos que explotan estas pequeñas diferencias para actuar selectivamente sobre los sistemas bacterianos. Estas armas bioquímicas son sintetizadas por algunos microorganismos y son extremadamente tóxicas para otros. Los antibióticos son herramientas muy valiosas en el estudio de la biosíntesis de proteínas, pues casi cada paso de la síntesis de proteínas puede ser inhibido específicamente por un antibiótico u otro.

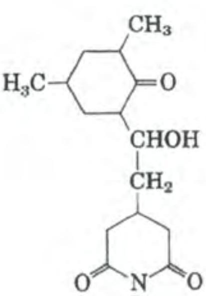
Uno de los antibióticos inhibidores mejor conocidos es la **puromicina,** producido por el hongo *Streptomyces alboniger*. Su estructura, muy similar al extremo 3′ de un aminoacil-tRNA, le permite fijarse al sitio A del ribosoma y participar en la formación del enlace peptídico, produciendo peptidil-puromicina **(Fig. 27–36)**. Sin embargo, puesto que la puromicina se parece solamente al extremo 3′ del tRNA, no participa en la translocación y se disocia del ribosoma poco después de haberse unido al extremo carboxilo del péptido, con lo cual termina prematuramente la síntesis del polipéptido.

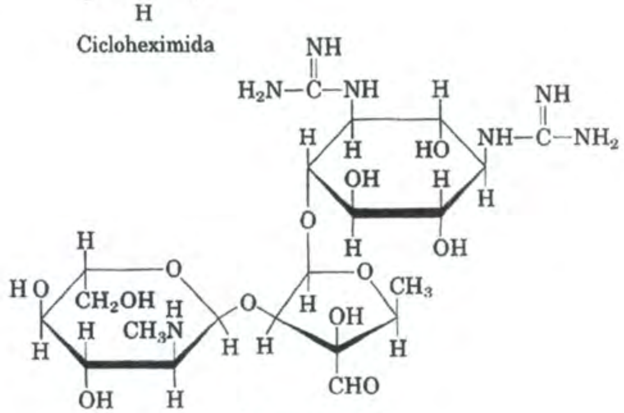
Las **tetraciclinas** inhiben la síntesis de proteínas en las bacterias al bloquear el sitio A del ribosoma, evitando así la unión de los aminoacil-tRNA. El **cloranfenicol** inhibe la síntesis de proteínas por los ribosomas bacterianos (y también en los mitocondriales y de los cloroplastos) al bloquear la transferencia de peptidilo, pero sin afectar la síntesis proteica citosólica en los eucariotas.

Por el contrario, la **cicloheximida** bloquea la peptidil transferasa de los ribosomas 80S eucarióticos, pero no la de los 70S bacterianos (y tampoco la de los ribosomas de cloroplastos y mitocondrias). La **estreptomicina,** un trisacárido básico, provoca una lectura incorrecta del código genético en las bacterias a concentraciones relativamente bajas e inhibe el inicio a concentraciones más elevadas.


Tetraciclina


Cloranfenicol


Cicloheximida


Estreptomicina

Otros inhibidores de la síntesis de proteínas son destacables por su toxicidad para el ser humano y otros mamíferos. La **toxina diftérica** (M_r 58.330) cataliza la ADP-ribosilación de un residuo diftamida (una histidina modificada) del factor

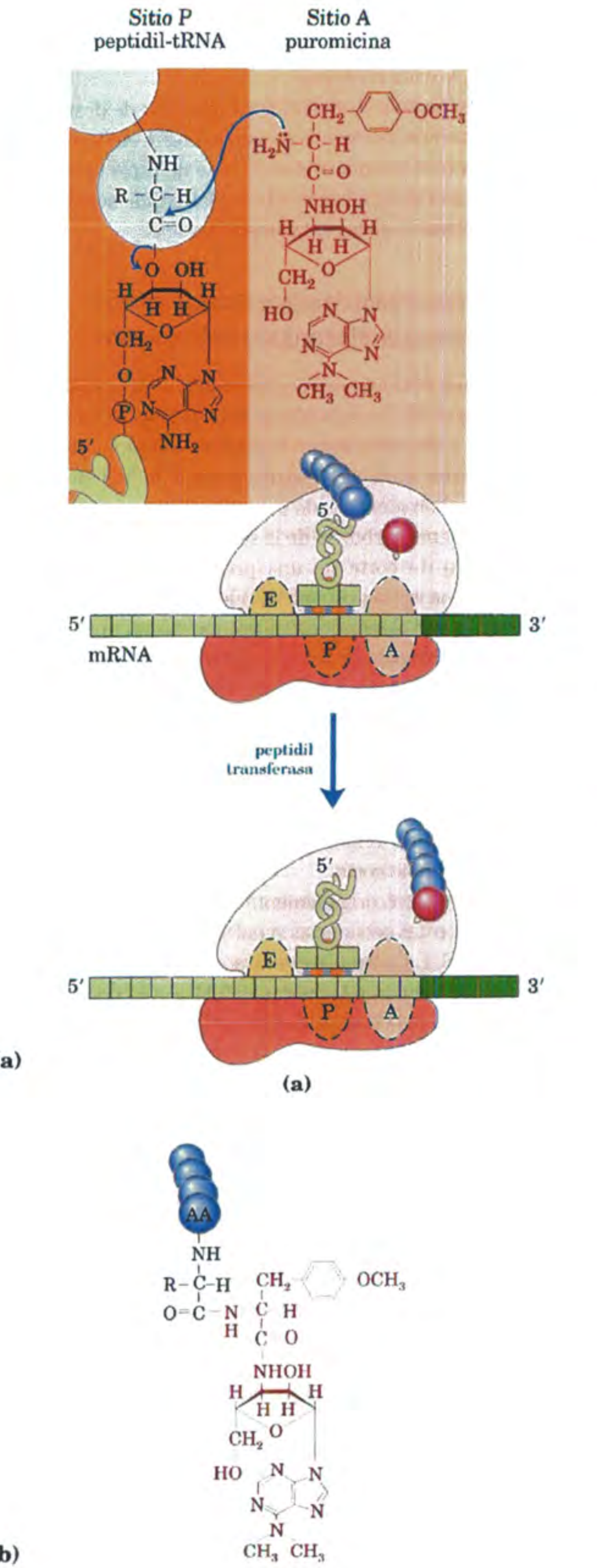


FIGURA 27–36 Alteración de la formación de enlaces peptídicos por la puromicina. (a) El antibiótico puromicina se parece al extremo aminoacilo de un tRNA cargado, pudiendo fijarse al sitio A del ribosoma y participar en la formación de un enlace peptídico (véase la Fig. 27–13d). El producto de esta reacción en lugar de ser translocado al sitio P, se disocia del ribosoma, causando la terminación prematura de la cadena. **(b)** Peptidil puromicina.

de elongación eucariótico eEF2, inactivándolo. La **ricina** (M_r 29.895), una proteína extremadamente tóxica obtenida del ricino, inactiva la subunidad 60S de los ribosomas eucarióticos al despurinar una adenosina específica del rRNA 23S.

RESUMEN 27.2 Síntesis de proteínas

- La síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas, que están formados por proteína y rRNA. Las bacterias tienen ribosomas 70S, con una subunidad grande (50S) y una pequeña (30S). Los ribosomas eucarióticos son significativamente mayores (80S) y contienen más proteínas.
- Los RNA de transferencia tienen de 73 a 93 residuos nucleotídicos, algunos con las bases modificadas. Cada tRNA tiene un brazo del aminoácido con la secuencia terminal CCA(3′) a la que se esterifica un aminoácido, un brazo del anticodón, un brazo TψC y un brazo D; algunos tRNA tienen un quinto brazo. El anticodón es responsable de la especificidad de la interacción entre el aminoacil-tRNA y el codón complementario en el mRNA.
- El crecimiento de los polipéptidos en los ribosomas empieza con el aminoácido amino-terminal y avanza por adición sucesiva de nuevos residuos hasta el extremo carboxilo-terminal.
- La síntesis proteica tiene lugar en cinco fases.

  1. Los aminoácidos son activados en el citosol por aminoacil-tRNA sintetasas. Estos enzimas catalizan la formación de aminoacil-tRNA, asociada a la hidrólisis del ATP a AMP y PP_i. La fidelidad de la síntesis proteica depende de la precisión de esta reacción y algunos de estos enzimas son capaces de realizar corrección de pruebas en sitios activos independientes.

  2. En las bacterias, el aminoacil-tRNA iniciador de todas las proteínas es el *N*-formilmetionil-$tRNA^{fMet}$. El inicio de la síntesis proteica comporta la formación de un complejo formado por la subunidad ribosómica 30S, mRNA, GTP, fMet–$tRNA^{fMet}$, tres factores de inicio y la subunidad 50S; el GTP se hidroliza a GDP y P_i.

  3. En las etapas de elongación se necesitan GTP y factores de elongación para la unión del aminoacil-tRNA entrante al sitio A del ribosoma. En la primera reacción de transferencia de peptidilo, el residuo fMet es transferido al grupo amino del aminoacil-tRNA entrante. A continuación, el movimiento del ribosoma a lo largo del mRNA transloca el dipeptidil-tRNA del sitio A al sitio P, en un proceso que requiere hidrólisis de GTP. Los tRNA desacilados se disocian del sitio E del ribosoma.

  4. Después de muchos ciclos de elongación semejantes, la síntesis del polipéptido termina con la ayuda de factores de liberación. Se necesitan al menos cuatro equivalentes de fosfato de alta energía (procedentes del ATP y el GTP) para formar cada enlace peptídico, inversión energética necesaria para garantizar la fidelidad de la traducción.

  5. Los polipéptidos se pliegan en sus formas activas tridimensionales. Muchas proteínas son modificadas ulteriormente mediante reacciones postraducción.

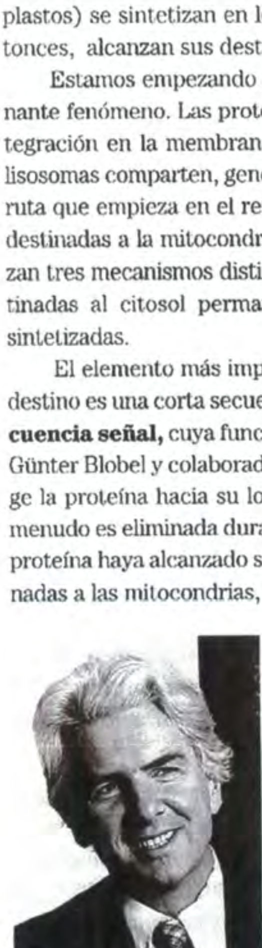
- Muchos antibióticos y toxinas bien estudiados inhiben algún aspecto de la síntesis proteica.

27.3 Destino y degradación de las proteínas

La célula eucariótica consta de muchas estructuras, compartimientos y orgánulos con funciones específicas que requieren conjuntos distintos de proteínas y enzimas. Estas proteínas (con excepción de las producidas en las mitocondrias y los plastos) se sintetizan en los ribosomas del citosol; ¿cómo, entonces, alcanzan sus destinos celulares finales?

Estamos empezando a comprender este complejo y fascinante fenómeno. Las proteínas destinadas a la secreción, la integración en la membrana plasmática o la integración en los lisosomas comparten, generalmente, los primeros pasos de una ruta que empieza en el retículo endoplasmático. Las proteínas destinadas a la mitocondrias, los cloroplastos o el núcleo utilizan tres mecanismos distintos, mientras que las proteínas destinadas al citosol permanecen en el lugar donde han sido sintetizadas.

El elemento más importante en muchas de estas rutas de destino es una corta secuencia de aminoácidos denominada **secuencia señal,** cuya función fue postulada por primera vez por Günter Blobel y colaboradores en 1970. La secuencia señal dirige la proteína hacia su localización apropiada en la célula y a menudo es eliminada durante el transporte o después de que la proteína haya alcanzado su destino final. En las proteínas destinadas a las mitocondrias, los cloroplastos o el RE, la secuencia señal se encuentra en el extremo amino-terminal del polipéptido recién sintetizado. En muchos casos, se ha podido confirmar la capacidad de direccionamiento de ciertas secuencias señal, fusionando la secuencia señal de una proteína con una segunda proteína; la señal dirige la segunda proteína a la localización donde normalmente se encuentra la primera proteína. La degradación selectiva de las proteínas que ya no se necesitan en la célula también depende en gran medida de un conjunto de señales moleculares integradas en la estructura de cada proteína.



Günter Blobel

En esta sección final se discuten los procesos de destino y degradación, con especial énfasis en las señales y en la regulación molecular que se encuentran en la base de estos procesos tan cruciales para el metabolismo celular. Salvo indicación contraria, nos centraremos en las células eucarióticas.

La modificación postraducción de muchas proteínas eucarióticas empieza en el retículo endoplasmático

El sistema de direccionamiento posiblemente mejor caracterizado empieza en el RE. La mayoría de proteínas lisososómicas, de membrana o secretadas tienen una secuencia amino-terminal que las marca para su translocación a la luz del RE **(Fig. 27–37)**; se han identificado centenares de estas secuencias señal. El extremo carboxilo de la secuencia señal está definido por un sitio de corte de una proteasa que elimina la secuencia señal una vez la proteína ha sido importada por el RE. Las secuencias señal tienen longitudes que varían entre 13 y 36 aminoácidos, pero todas tienen en común las siguientes características: (1) entre 10 y 15 residuos aminoácidos hidrofóbicos; (2) uno o más residuos cargados positivamente, normalmente cerca del extremo amino-terminal y por delante de la secuencia hidrofóbica, y (3) una corta secuencia en el extremo carboxilo (cerca del sitio de corte) que es relativamente polar, con aminoácidos de cadena corta (especialmente Ala) en las posiciones más cercanas al sitio de corte.

Tal como demostró originalmente George Palade, las proteínas que tienen estas secuencias señal se sintetizan en ribosomas unidos al RE. La propia secuencia señal dirige el ribosoma al RE, tal como ilustran los pasos del ① al ⑧ de la **Figura 27–38.** ① La ruta de direccionamiento empieza con el inicio de la síntesis proteica en ribosomas libres. ② La secuencia señal aparece pronto en el proceso de síntesis, ya que se encuentra en el extremo amino-terminal, que, tal como hemos visto, es sintetizado primero. ③ A medida que emerge del ribosoma, la secuencia señal y el propio ribosoma se unen a una gran **partícula de reconocimiento de la señal (SRP);** a continuación la SRP une GTP y detiene la elongación del polipéptido cuando

sitio de corte ↓

Virus A de la gripe humana	Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Tyr Ala Phe Val Ala Gly ↓ Asp Gln --
Preproinsulina humana	Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala ↓ Phe Val --
Hormona del crecimiento bovina	Met Met Ala Ala Gly Pro Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Ala Leu Leu Cys Leu Pro Trp Thr Gln Val Val Gly ↓ Ala Phe --
Promelitina de abeja	Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile Ser Tyr Ile Tyr Ala ↓ Ala Pro --
Proteína adhesiva de *Drosophila*	Met Lys Leu Leu Val Val Ala Val Ile Ala Cys Met Leu Ile Gly Phe Ala Asp Pro Ala Ser Gly ↓ Cys Lys --

FIGURA 27–37 Secuencias señal amino-terminales de algunas proteínas eucarióticas que dirigen la translocación al RE. El núcleo hidrofóbico (amarillo) está precedido por uno o más residuos básicos (azul). Obsérvese la presencia de residuos polares y de cadena lateral corta inmediatamente antes (a la izquierda tal como se muestra aquí) de los sitios de corte (indicados por flechas rojas).

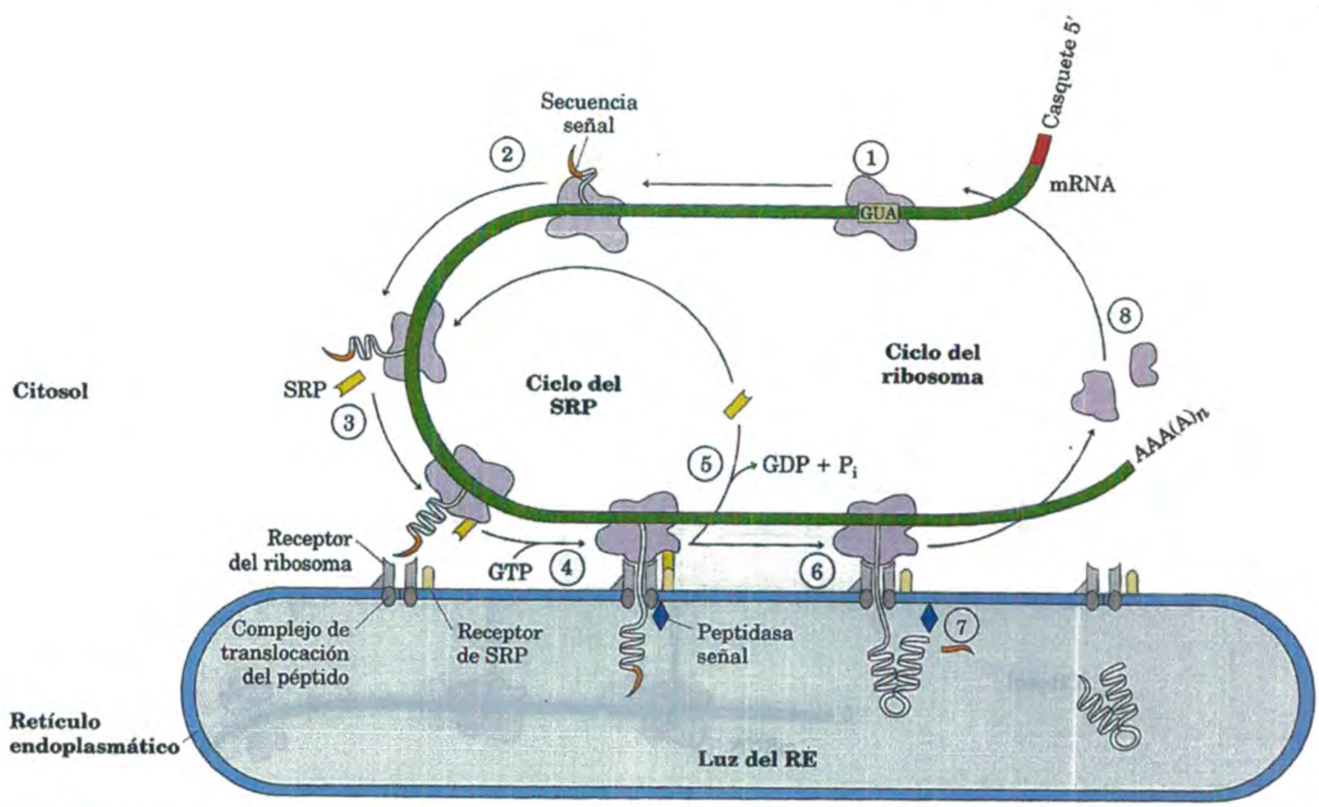


FIGURA 27–38 Envío de proteínas eucarióticas mediante señales apropiadas al retículo endoplasmático. Este proceso incluye el ciclo de la SRP y la translocación y corte del polipéptido en crecimiento. Las diferentes etapas se describen en el texto. La SRP es un complejo en forma de varilla que contiene un RNA de 300 nucleótidos (denominado 7SL-RNA) y seis proteínas diferentes (con una M_r combinada de 325.000). Una subunidad proteica de la SRP se une directamente a la secuencia señal, inhibiendo la elongación por bloqueo estérico de la entrada de aminoacil-tRNA e inhibición de la peptidil transferasa. Otra subunidad proteica une e hidroliza GTP. El receptor de la SRP es un heterodímero de subunidades α (M_r 69.000) y β (M_r 30.000), en el que ambas subunidades hidrolizan muchas moléculas de GTP durante el proceso.

George Palade

alcanza unos 70 aminoácidos y la secuencia señal ya ha emergido completamente del ribosoma. ④ La SRP ligada a GTP dirige el ribosoma (todavía unido al mRNA) y el polipéptido incompleto a receptores de la SRP ligada a GTP de la cara citosólica del RE; el polipéptido en curso de crecimiento es transferido a un **complejo de translocación de péptidos** en el RE, que posiblemente interacciona directamente con el ribosoma. ⑤ La SRP se disocia del ribosoma y a la vez se hidroliza el GTP, tanto en la SRP como en su receptor. ⑥ A continuación se reanuda la elongación del polipéptido, mientras que el complejo de translocación, impulsado por ATP, va introduciendo el polipéptido en crecimiento dentro de la luz del RE hasta la finalización de la síntesis de la proteína. ⑦ La secuencia señal es eliminada mediante una peptidasa señal dentro de la luz del RE. ⑧ Finalmente, el ribosoma se disocia y es reciclado.

La glucosilación juega un papel clave en el destino de las proteínas

Las proteínas que acaban de ser sintetizadas son ulteriormente modificadas en la luz del RE de diversas maneras. Después de la eliminación de las secuencias señal, los polipéptidos se pliegan, se forman los puentes disulfuro y muchas proteínas son glucosiladas para formar glucoproteínas. En muchas glucoproteínas, la unión con los oligosacáridos es a través de residuos Asn. Estos oligosacáridos unidos por enlaces *N* son muy variados (Capítulo 7), pero sus rutas de formación tienen un primer paso común. Un oligosacárido núcleo de 14 residuos es sintetizado paso a paso y después transferido desde una molécula dadora de dolicol fosfato a ciertos residuos Asn de la proteína (**Fig. 27–39**). La transferasa se encuentra en la cara interior del RE y por tanto no puede catalizar la glucosilación de las proteínas citosólicas. Después de la transferencia, el oligosacárido núcleo es recortado y elaborado de distintas formas en las diferentes proteínas, pero todos los oligosacáridos unidos por enlace *N* conservan un núcleo pentasacárido derivado del oligosacárido original de 14 residuos. Varios antibióticos actúan interfiriendo con uno o

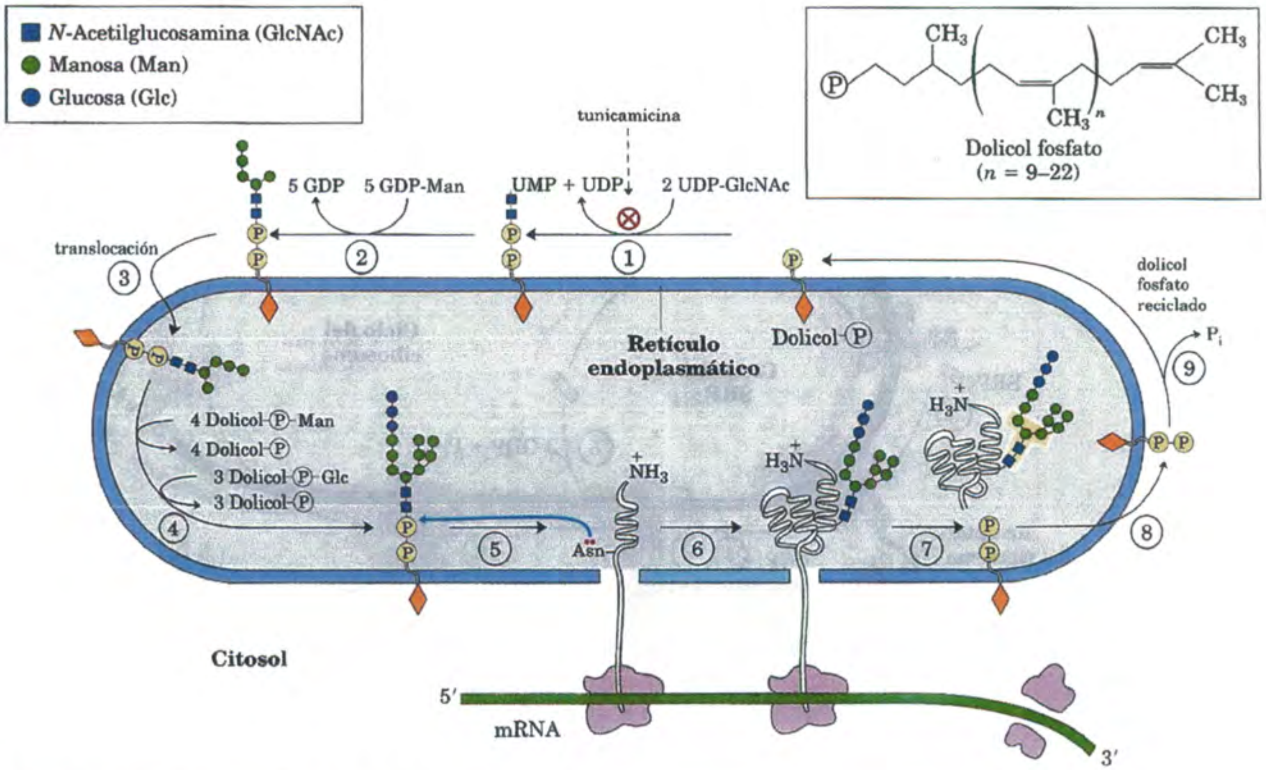
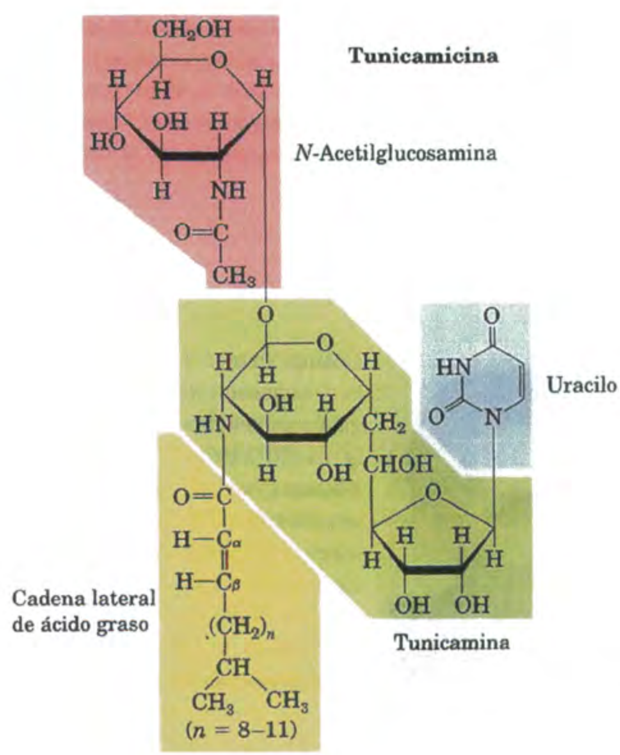


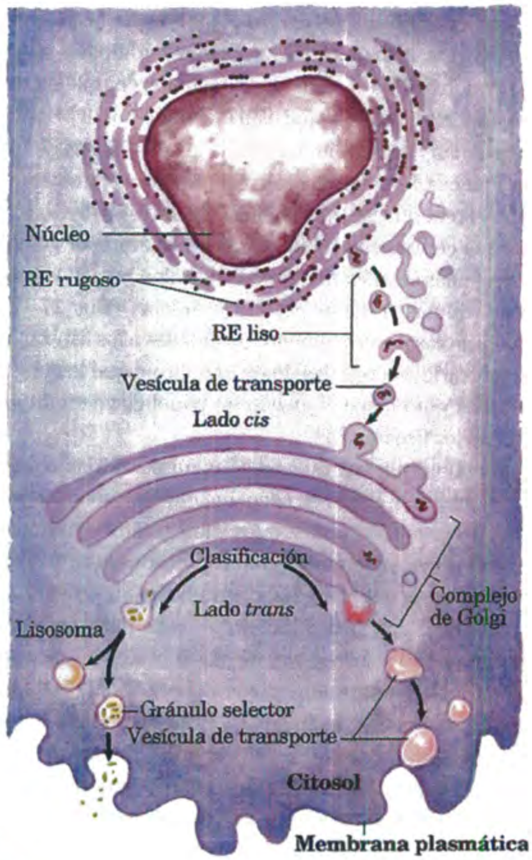
FIGURA 27–39 Síntesis del oligosacárido núcleo de las glucoproteínas. El oligosacárido núcleo se forma por adición sucesiva de unidades de monosacárido. ①, ② Los primeros pasos tienen lugar en la cara citosólica del RE. ③ La translocación desplaza el oligosacárido incompleto a través de la membrana (mecanismo no mostrado) y ④ la finalización tiene lugar dentro de la luz del RE. Los precursores que aportan residuos de manosa y glucosa adicionales al oligosacárido en formación en la luz del RE son derivados del dolicol fosfato. En el primer paso de la formación de los oligosacáridos de las glucoproteínas unidos por enlace *N*, ⑤, ⑥ el oligosacárido núcleo es transferido desde el dolicol fosfato a un residuo Asn de la proteína en la luz del RE. El oligosacárido núcleo es modificado ulteriormente en el RE y en el complejo de Golgi, en rutas que difieren según las distintas proteínas. Los cinco residuos glucídicos sobre fondo beige (después del paso ⑦) persisten en la estructura final de todos los oligosacáridos unidos por enlace *N*. ⑧ El dolicol pirofosfato liberado es de nuevo translocado, de forma que el pirofosfato se encuentre de nuevo en la cara citosólica del RE; finalmente ⑨, se hidroliza un fosfato para regenerar el dolicol fosfato.



más pasos de este proceso y han sido de utilidad en el estudio de los pasos implicados en la glucosilación de proteínas. El mejor antibiótico caracterizado es la **tunicamicina,** que guarda un gran parecido con la estructura de la UDP-*N*-acetilglucosamina y bloquea el primer paso del proceso (Fig. 27–39, paso ①). Algunas proteínas están *O*-glucosiladas, pero la mayor parte de la *O*-glucosilación se produce en el complejo de Golgi o en el citosol (para proteínas que no entran en el RE).

A continuación, las proteínas adecuadamente modificadas pueden ser transportadas hasta diversos destinos celulares. Las proteínas se desplazan desde el RE al complejo de Golgi en vesículas de transporte **(Fig. 27–40)**. En el complejo de Golgi se añaden los oligosacáridos unidos por enlace *O*, mientras que los unidos por enlace *N* sufren modificaciones adicionales. En el complejo de Golgi también se clasifican las proteínas, mediante mecanismos todavía no aclarados por completo, para ser enviadas a sus destinos finales. Los procesos que separan las proteínas destinadas a la secreción de las destinadas a la membrana

FIGURA 27–40 Ruta seguida por las proteínas destinadas a los lisosomas, la membrana plasmática o la secreción. Las proteínas se desplazan desde el RE al lado *cis* del complejo de Golgi en vesículas de transporte. La clasificación tiene lugar principalmente en el lado *trans* del complejo de Golgi.



plasmática o a los lisosomas tienen que distinguir entre estas proteínas sobre la base de rasgos estructurales distintos de las secuencias señal, que han sido eliminadas en la luz del RE.

El proceso de clasificación mejor conocido es el de las hidrolasas, destinadas a los lisosomas. Al llegar una hidrolasa (una glucoproteína) al complejo de Golgi, algún rasgo estructural aún no determinado de la estructura tridimensional de la hidrolasa (denominado a veces parche señal) es reconocido por una fosfotransferasa que cataliza la fosforilación de ciertos residuos de manosa del oligosacárido (**Fig. 27–41**). La presencia de uno o varios residuos de manosa 6-fosfato en sus oligosacáridos unidos por enlace *N* es la señal estructural que dirige la proteína a los lisosomas. Una proteína receptora en la membrana del complejo de Golgi reconoce la señal de manosa 6-fosfato y une las hidrolasas marcadas de este modo. Las vesículas que contienen

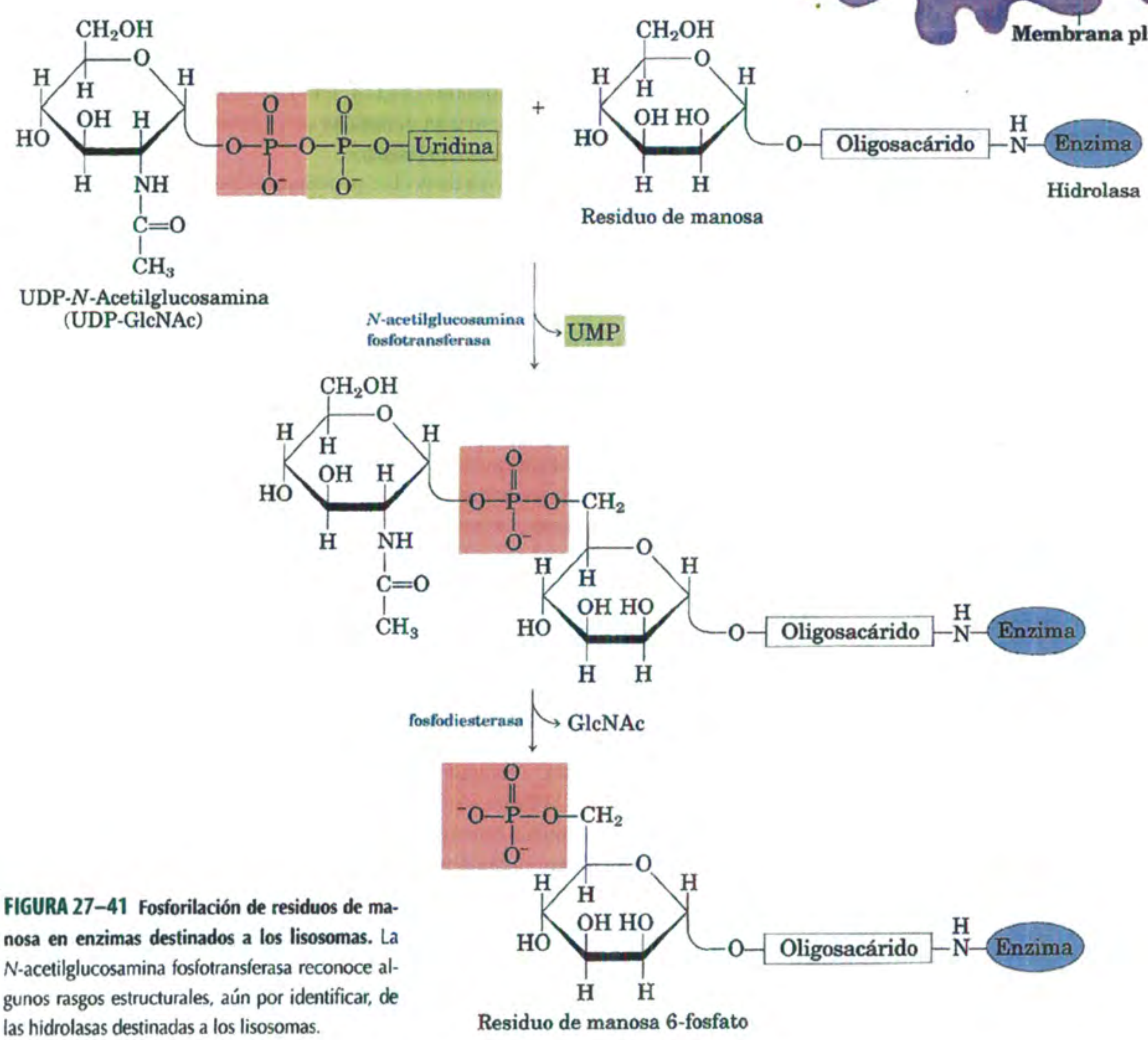


FIGURA 27–41 Fosforilación de residuos de manosa en enzimas destinados a los lisosomas. La *N*-acetilglucosamina fosfotransferasa reconoce algunos rasgos estructurales, aún por identificar, de las hidrolasas destinadas a los lisosomas.

estos complejos receptor-hidrolasa producen una gemación en el lado trans del complejo de Golgi y se abren camino hasta vesículas clasificadoras. Una vez allí se disocian los complejos receptor-hidrolasa en un proceso que está facilitado por el pH más bajo de las vesículas y por la eliminación de grupos fosfato de los residuos de manosa 6-fosfato, catalizada por una fosfatasa. A continuación, el receptor se recicla hacia el complejo de Golgi y las vesículas que contienen las hidrolasas se separan por gemación de las vesículas clasificadoras y se trasladan hacia los lisosomas. En las células tratadas con tunicamicina (Fig. 27–39, paso ①), las hidrolasas normalmente destinadas a los lisosomas son, por el contrario, secretadas, lo que confirma que los oligosacáridos unidos por enlace *N* juegan un papel clave en dirigir estos enzimas a los lisosomas.

Las rutas que dirigen proteínas a las mitocondrias o a los cloroplastos también se basan en secuencias señal amino-terminales. Aunque las mitocondrias y los cloroplastos contienen DNA, la mayoría de sus proteínas están codificadas por DNA nuclear y deben ser dirigidas al orgánulo apropiado. Sin embargo, a diferencia de otras rutas de destino, las rutas de mitocondrias y cloroplastos empiezan sólo *después* de que la proteína precursora haya sido completamente sintetizada y liberada del ribosoma. Las proteínas precursoras destinadas a las mitocondrias o a los cloroplastos se unen a chaperonas citosólicas y se transfieren a receptores de la superficie exterior del orgánulo diana. A continuación, mecanismos de translocación especializados transportan la proteína hasta su destino final en el orgánulo; una vez alcanzado, la secuencia señal es eliminada.

Las secuencias señal para el transporte nuclear no son cortadas

La comunicación molecular entre el núcleo y el citosol requiere el movimiento de macromoléculas a través de poros nucleares. Las moléculas de RNA sintetizadas en el núcleo son exportadas al citosol. Las proteínas ribosómicas sintetizadas en los ribosomas citosólicos son importadas por el núcleo y ensambladas en el nucleolo para formar las subunidades ribosómicas 60S y 40S, que una vez completadas son exportadas de vuelta al citosol. Una gran variedad de proteínas nucleares (RNA y DNA polimerasas, histonas, topoisomerasas, proteínas reguladoras de la expresión génica y muchas otras) se sintetizan en el citosol y son importadas por el núcleo. Este tráfico es modulado por un complejo sistema de señales moleculares y proteínas de transporte que poco a poco va siendo desvelado.

En la mayoría de eucariotas pluricelulares, la envoltura nuclear se desorganiza en cada división celular y una vez finalizada la división celular y restablecida la envoltura nuclear, las proteínas nucleares dispersadas deben ser reimportadas. Para hacer posible la importación nuclear reiterada, la secuencia señal que dirige la proteína al núcleo, la **secuencia de localización nuclear, NLS,** no es eliminada una vez la proteína ha alcanzado su destino. A diferencia de otras secuencias señal, una NLS puede encontrarse en casi cualquier posición de la secuencia primaria de la proteína. Las NLS son muy variables, pero muchas consta de cuatro a ocho residuos aminoácidos y contienen varios residuos básicos (Arg o Lys) consecutivos.

La importación en el núcleo está facilitada por un conjunto de proteínas que establecen un ciclo entre el citosol y el núcleo **(Fig. 27–42)**, entre las que se encuentran las importinas α y β y una pequeña GTPasa denominada Ran (proteína nuclear relacionada con *Ras*). Un heterodímero de importina α y β actúa de receptor soluble para las proteínas destinadas al núcleo, en el cual la subunidad α se une a las proteínas del citosol que poseen la secuencia NLS. El complejo de la proteína que contiene la secuencia NLS y la importina se une a un poro nuclear y es translocada a través del poro mediante un mecanismo dependiente de energía. En el núcleo, la importina α se une a la GTPasa Ran y la proteína importada se disocia de la importina α. La importina α se une a Ran y CAS (proteína celular de susceptibilidad a la apoptosis) y se separa de la proteína portadora de la NLS. Las importinas α y β, en sus complejos con Ran y CAS, son entonces exportadas fuera del núcleo. Ran hidroliza GTP en el citosol para liberar las importinas, que pueden iniciar otro ciclo de importación. La propia Ran es también reciclada de nuevo en el núcleo a través de la unión de Ran-GDP al factor 2 de transporte nuclear (NTF2). Dentro del núcleo, el GDP unido a Ran es reemplazado por GTP mediante la actividad del factor Ran de intercambio de nucleótido de guanosina (RanGEF; véase el Recuadro 12–2).

Las bacterias también utilizan secuencias señal para el destino de las proteínas

Las bacterias pueden dirigir proteínas a las membranas interna o externa, al espacio periplasmático entre estas membranas o al medio extracelular. Utilizan secuencias señal en el extremo amino de las proteínas **(Fig. 27–43)**, parecidas a las encontradas en las proteínas eucarióticas destinadas al RE, a las mitocondrias y a los cloroplastos.

La mayor parte de las proteínas exportadas por *E. coli* usan la ruta mostrada en la **Figura 27–44**. Después de la traducción, una proteína destinada a la exportación puede plegarse sólo lentamente, pues su secuencia amino-terminal impide el plegamiento. La proteína chaperona soluble SecB se une a la secuencia señal de la proteína o a otras características de su estructura parcialmente plegada. Unida es entonces transferida a SecA, una proteína asociada a la superficie interna de la membrana plasmática. SecA actúa tanto de receptor como de ATPasa de translocación. Una vez liberada de SecB y unida a SecA, la proteína es transferida a un complejo de translocación en la membrana, formado por SecY, E y G, y es translocada paso a paso al otro lado de la membrana a través del complejo SecYEG a trozos de unos 20 aminoácidos. Cada paso es facilitado por la hidrólisis de ATP, catalizada por SecA.

Una proteína exportada es, pues, empujada a través de la membrana por una proteína SecA localizada en la superficie citoplasmática, en lugar de de ser extraída a través de la membrana por una proteína localizada en la superficie periplasmática. Esta diferencia puede reflejar simplemente la necesidad de la ATPasa de encontrarse donde el ATP esté disponible. El potencial electroquímico transmembrana puede también suministrar energía para la translocación de una proteína destinada a la exportación, mediante un mecanismo todavía no aclarado.

Aunque la mayoría de las proteínas bacterianas exportadas emplean esta ruta, algunas utilizan una ruta alternativa que depende de señales de reconocimiento y de proteínas receptoras

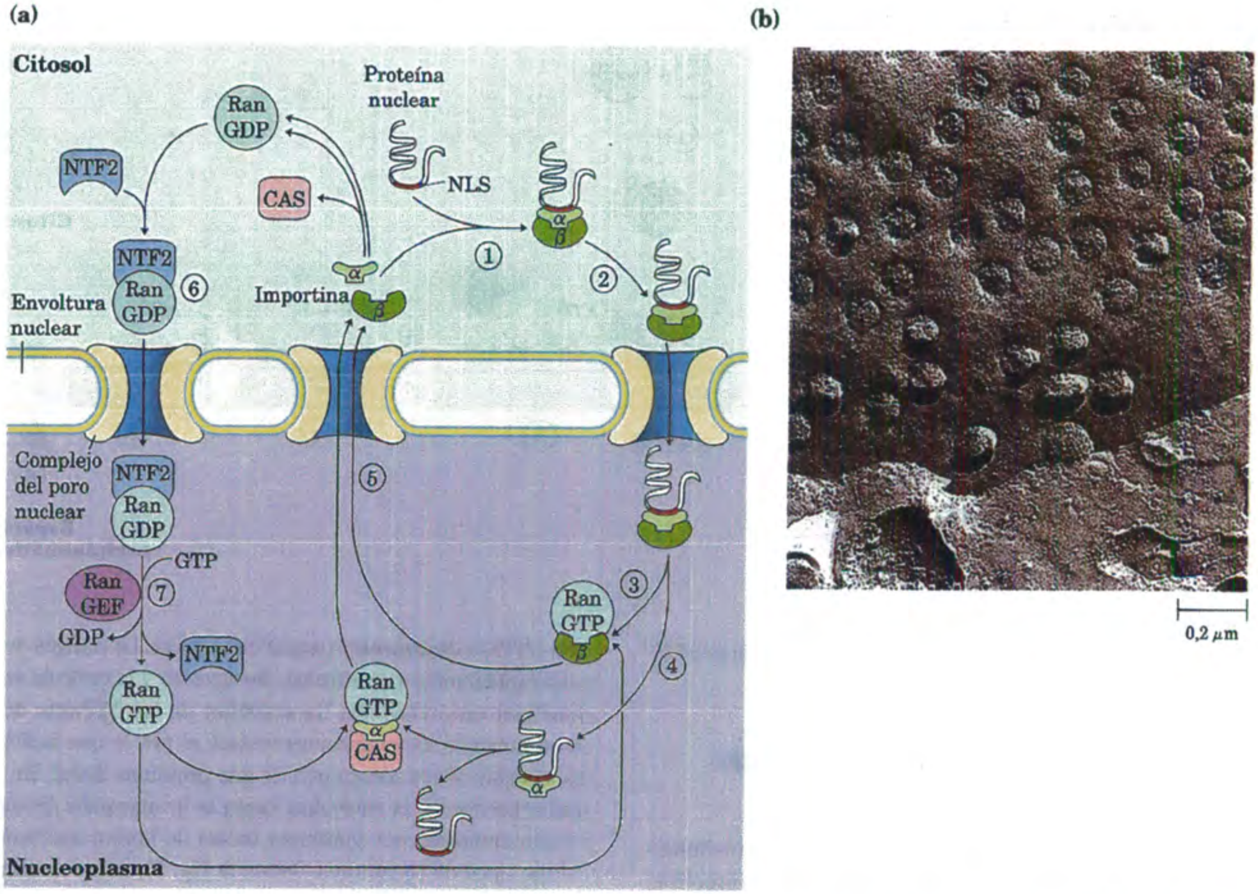


FIGURA 27–42 Direccionamiento de proteínas nucleares. (a) ① Una proteína con una señal de localización nuclear (NLS) adecuada se une a un complejo de importina α y β. ② El complejo resultante se une a un poro nuclear y se transloca. ③ Dentro del núcleo la disociación de la importina β es facilitada por la unión de Ran-GTP. ④ La importina α se une a Ran-GTP y CAS (proteína de susceptibilidad a la apoptosis celular), liberándose la proteína nuclear. ⑤ Las importinas α y β y CAS son transportadas fuera del núcleo, donde son recicladas. ⑥ La Ran-GDP se une a NTF2 y es transportada de nuevo al núcleo. ⑦ RanGEF promueve el intercambio de GDP por GTP en el núcleo, y la Ran-GTP está dispuesta para modificar otro complejo de importina con una proteína con NLS. **(b)** Micrografía electrónica de barrido de la superficie de la envoltura nuclear en la que pueden observarse numerosos poros nucleares.

	sitio de corte ↓
Proteínas de la membrana interna	
Proteína principal de la cubierta del fago fd	Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu Val Pro Met Leu Ser Phe Ala ↓ Ala Glu –
Proteína minoritaria de la cubierta del fago fd	Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser ↓ Ala Glu –
Proteínas periplasmáticas	
Fosfata alcalina	Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala ↓ Arg Thr –
Proteína específica fijadora de leucina	Met Lys Ala Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala Ile Ser His Thr Ala Met Ala ↓ Asp Asp –
β-Lactamasa de pBR322	Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe Ala ↓ His Pro –
Proteínas de la membrana externa	
Lipoproteína	Met Lys Ala Thr Lys Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Ser Thr Leu Leu Ala Gly ↓ Cys Ser –
LamB	Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala ↓ Val Asp –
OmpA	Met Met Ile Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala ↓ Ala Pro –

FIGURA 27–43 Secuencias señal utilizadas para el destino a diferentes localizaciones en bacterias. Se resaltan los aminoácidos básicos (azul) cerca del extremo amino-terminal y los aminoácidos del núcleo hidrofóbico (amarillo). Los sitios de corte que marcan los extremos de las secuencias señal se indican con flechas rojas. Obsérvese que la membrana celular bacteriana interna (véase la Fig. 1–6) es el lugar donde tiene lugar el ensamblaje de las proteínas de la cubierta y el DNA que producirá las partículas del fago fd. OmpA es la proteína A de la membrana externa; LamB es una proteína receptora del bacteriófago lambda de la superficie celular.

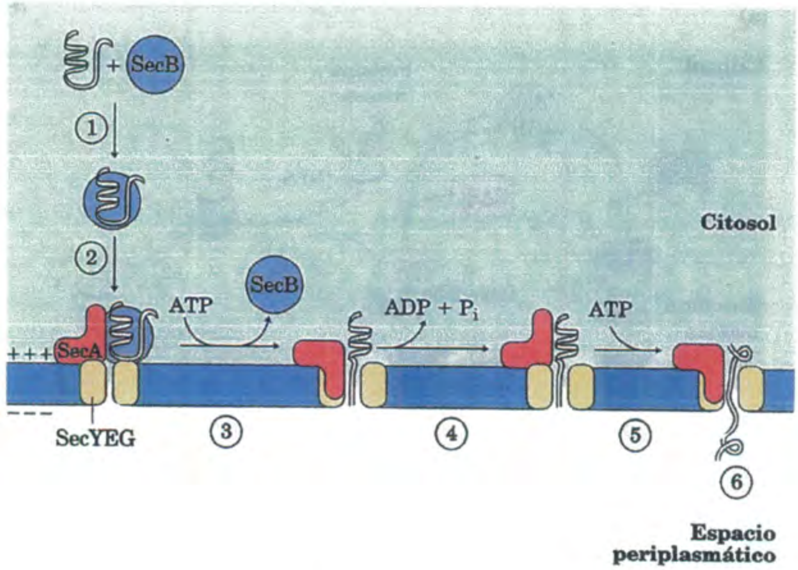


FIGURA 27–44 Modelo de la exportación de proteínas en las bacterias. (1) Un polipéptido recién sintetizado se une a la chaperona citosólica SecB, que (2) lo transfiere a SecA, una proteína asociada con el complejo de translocación (SecYEG) en la membrana celular bacteriana. (3) SecB es liberada y SecA se inserta en la membrana, forzando la exportación de unos 20 residuos aminoácidos de la proteína destinada a la exportación a través del complejo de translocación. (4) La hidrólisis de ATP por SecA suministra la energía para un cambio de conformación que provoca que SecA abandone la membrana y libere el polipéptido. (5) SecA une otra molécula de ATP y un nuevo fragmento de 20 aminoácidos es empujado a través de la membrana por el complejo de translocación. Los pasos (4) y (5) se repiten hasta que (6) la proteína entera ha pasado al otro lado y ha sido liberada en el periplasma. El potencial electroquímico a través de la membrana (indicado por + y −) también suministra parte de la fuerza motriz necesaria para la translocación de la proteína.

homólogas a los componentes de las SRP y los receptores SRP eucarióticos (Fig. 27–38).

Las células importan proteínas mediante endocitosis facilitada por receptores

Las células importan algunas proteínas del medio circundante, tales como la lipoproteína de baja densidad (LDL), la proteína transportadora de hierro transferrina, hormonas peptídicas y proteínas circulantes destinadas a la degradación. Hay varias rutas de importación **(Fig. 27–45)**. En una de estas rutas, las proteínas se unen a receptores en invaginaciones de la membrana denominadas **cavidades recubiertas,** que concentran receptores destinados a la endocitosis, con preferencia a otras proteínas de la superficie celular. Las cavidades están recubiertas en su lado citosólico por una malla de la proteína **clatrina,** que forma estructuras poliédricas cerradas **(Fig. 27–46)**. La malla de clatrina crece a medida que los receptores van siendo ocupados por proteínas diana, hasta que una vesícula endocítica completa unida a la membrana se separa por gemación de la membrana plasmática con ayuda de la gran GTPasa **dinamina** y pasa al citoplasma. La clatrina se elimina rápidamente por enzimas decapantes y la vesícula se fusiona con un endosoma. La actividad de las ATPasas de las membranas de los endosomas reduce el pH, lo que facilita la disociación de los receptores de sus proteínas diana. En una ruta relacionada, la caveolina causa la invaginación de zonas de la membrana que contienen balsas de lípidos asociados a ciertos tipos de receptores (véase la Fig. 11–21). A continuación estas vesículas endocíticas se fusionan con estructuras internas con caveolina, los caveosomas, donde las moléculas internalizadas son clasificadas y dirigidas a otras partes de la célula, tras lo cual las caveolinas pueden ser recicladas en la superficie de la membrana. También hay rutas independientes de clatrina y de caveolina; algunas usan dinamina y otras no.

Las proteínas importadas y los receptores siguen vías distintas y su destino depende del tipo de célula y del tipo de proteína. La transferrina y su receptor finalmente se reciclan. Algunas hormonas, factores de crecimiento y complejos inmunes se degradan junto con sus receptores después de haber producido la respuesta celular apropiada. Las LDL se degradan después de que el colesterol que transportan haya llegado a

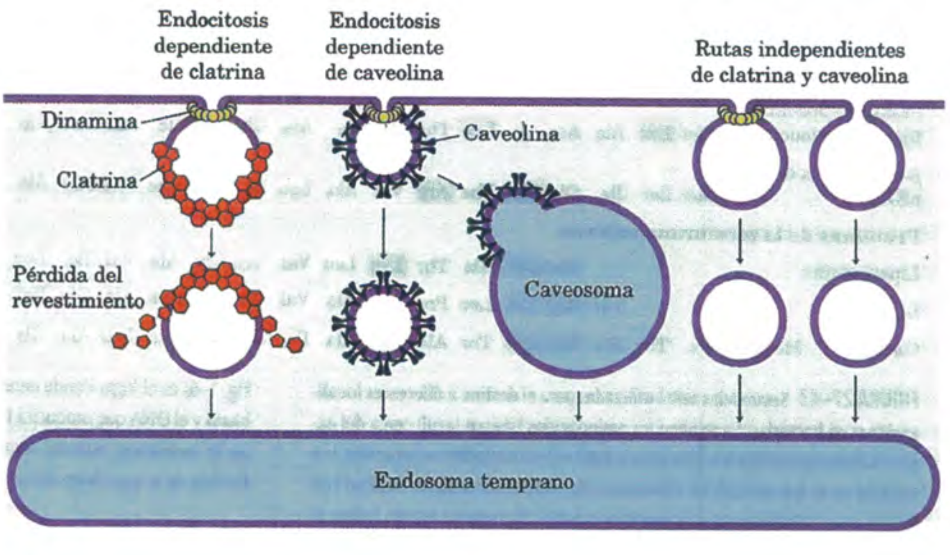


FIGURA 27–45 Resumen de las vías de endocitosis en las células eucarióticas. Las vías dependientes de clatrina o caveolina utilizan la GTPasa dinamina para generar vesículas a partir de la membrana plasmática. Algunas vías no utilizan clatrina o caveolina; algunas utilizan dinamina y otras no.

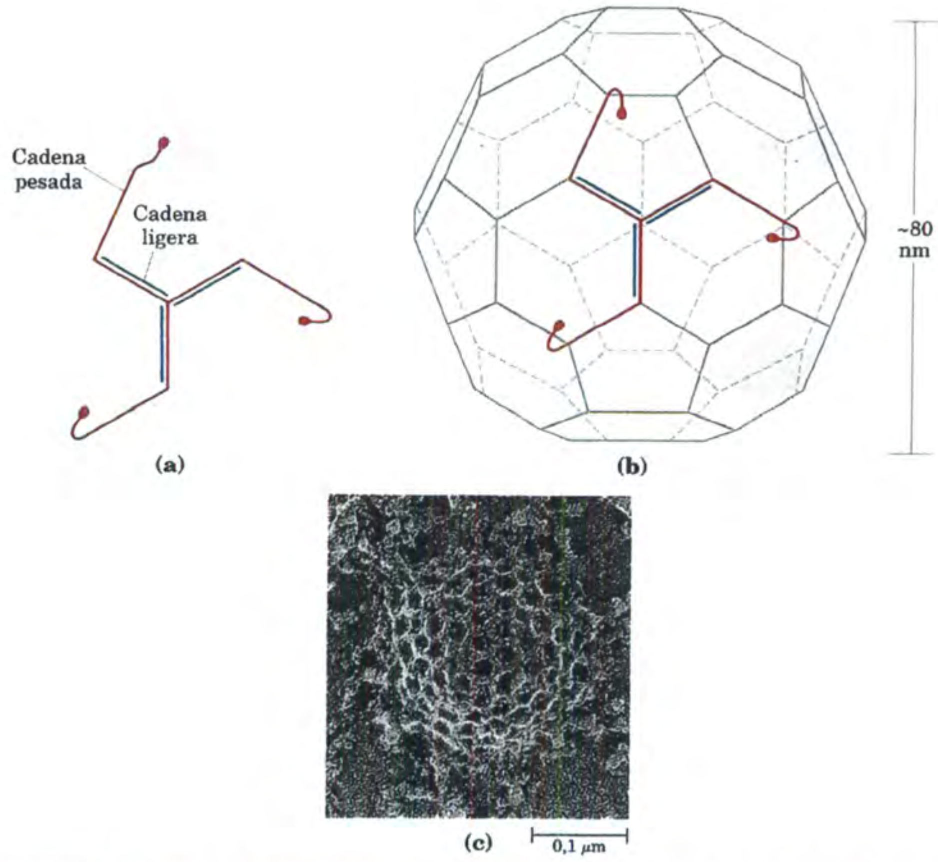


FIGURA 27–46 Clatrina. **(a)** Tres cadenas ligeras (L) (M_r 35.000) y tres cadenas pesadas (H) (M_r 180.000) forman la unidad de clatrina $(HL)_3$, organizada en una estructura de tres patas denominada triesquelion. **(b)** Los triesqueliones tienen tendencia a ensamblarse en redes poliédricas. **(c)** Micrografía electrónica de una cavidad revestida en la cara citosólica de la membrana plasmática de un fibroblasto.

su destino, pero el receptor de las LDL es reciclado (véase la Fig. 21–42).

La endocitosis mediada por receptor es aprovechada por algunas toxinas y virus para entrar en las células. La toxina diftérica, la toxina del cólera y el virus de la gripe entran en las células por esta vía.

Todas las células disponen de sistemas de degradación de proteínas especializados

La degradación de proteínas impide la acumulación de proteínas defectuosas o innecesarias y permite el reciclado de los aminoácidos. La vida media de las proteínas eucarióticas varía desde 30 segundos a muchos días. El recambio de la mayoría de proteínas es rápido en relación con el tiempo de vida de las células, aunque unas pocas (como la hemoglobina) pueden durar toda la vida de una célula (unos 110 días para un eritrocito). Entre las proteínas que se degradan rápidamente se encuentran las que son defectuosas debido a la introducción de uno o varios aminoácidos incorrectos durante la síntesis o a causa del deterioro acumulado durante el funcionamiento normal. Los enzimas que actúan en puntos reguladores clave de las rutas metabólicas a menudo experimentan un recambio rápido.

Las proteínas defectuosas y las que tienen vidas medias cortas generalmente se degradan, tanto en bacterias como en eucariotas, por sistemas citosólicos dependientes de ATP. En los vertebrados, un segundo sistema que opera en los lisosomas recicla los aminoácidos de las proteínas de membrana, de las proteínas extracelulares y de las proteínas de vida media larga.

En *E. coli*, muchas proteínas son degradadas por una proteasa dependiente de ATP denominada Lon (el nombre se refiere a la "forma larga" de las proteínas, sólo observada cuando esta proteasa está ausente). La proteasa se activa en presencia de proteínas defectuosas o de aquellas que están sometidas a recambio rápido; se hidrolizan dos moléculas de ATP por cada enlace peptídico cortado. El papel exacto de la hidrólisis de ATP no está claro. Una vez que la proteína ha sido reducida a péptidos pequeños e inactivos, otras proteasas independientes de ATP completan el proceso de degradación.

En las células eucarióticas, la ruta dependiente de ATP es totalmente diferente. Un componente clave del sistema es la proteína **ubiquitina,** que como su nombre indica está presente en todos los reinos eucarióticos. La ubiquitina (76 residuos aminoácidos), una de las proteínas más conservadas conocidas, es prácticamente idéntica en organismos tan diferentes como las levaduras y el ser humano. La ubiquitina se une covalentemente a proteínas destinadas a la destrucción a través de una ruta dependiente de ATP en la que intervienen tres enzimas diferentes (E1, E2 y E3 en la **Fig. 27–47**).

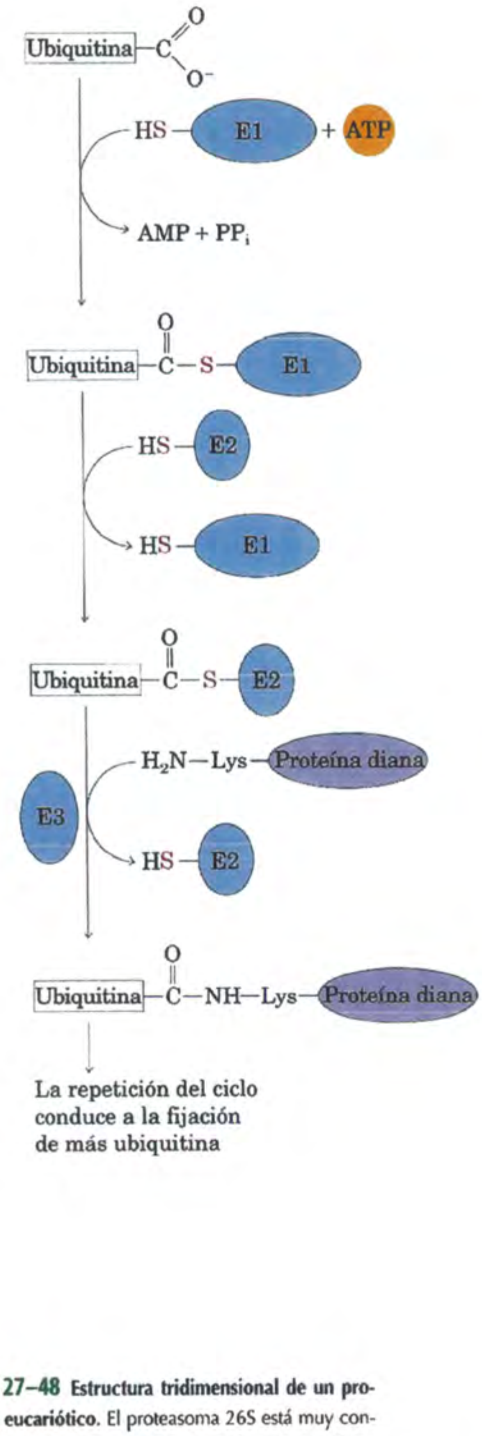


FIGURA 27–47 Proceso en tres pasos por el que la ubiquitina se une a una proteína. Intervienen dos intermedios enzima-ubiquitina diferentes. El grupo carboxilo libre del residuo Gly carboxilo-terminal de la ubiquitina se une finalmente a través de un enlace amida (isopeptídico) a un grupo ε-amino de un residuo Lys de la proteína diana. Ciclos adicionales producen poliubiquitina, un polímero covalente de subunidades de ubiquitina, que señala a la proteína unida para destrucción en los eucariotas.

Las proteínas ubiquitinadas son degradadas por un gran complejo (M_r 2,5 × 10^6) denominado **proteasoma 26S (Fig. 27–48)**. El proteasoma eucariótico consiste en dos copias de cada una de al menos 32 subunidades diferentes, la mayor parte de las cuales están muy conservadas desde las levaduras a los humanos. El proteasoma contiene dos tipos principales de subcomplejos, una partícula núcleo en forma de barril y partículas reguladoras en ambos extremos del barril. La partícula núcleo 20S consta de cuatro anillos; los anillos exteriores están formados por siete subunidades *α* y los anillos interiores por siete subunidades *β*. Tres de las siete subunidades de cada anillo *β* tienen actividad proteasa, cada una con una especificidad de sustrato diferente. Los anillos apilados de la partícula núcleo forman la estructura en forma de barril, en el interior de la cual se degradan las proteínas diana. La partícula reguladora 19S en cada extremo de la partícula núcleo contiene aproximadamente 18 subunidades, algunas de las cuales reconocen e interaccionan con proteínas ubiquitinadas. Seis de las subunidades son AAA+ ATPasas (véase el Capítulo 25), que probablemente estén implicadas en el desplegamiento de las proteínas ubiquitinadas y en la translocación del polipéptido desplegado al interior de la partícula núcleo para su degradación. La partícula 19S también desubiquitina las proteínas a medida que son degradadas en el proteasoma. La mayoría de las células tienen complejos reguladores adicionales que pueden reemplazar la partícula 19S. Estos reguladores alternativos no hidrolizan ATP y no se unen a la ubiquitina, pero son importantes en la degradación de determinadas proteínas celulares. El proteasoma 26S puede ser

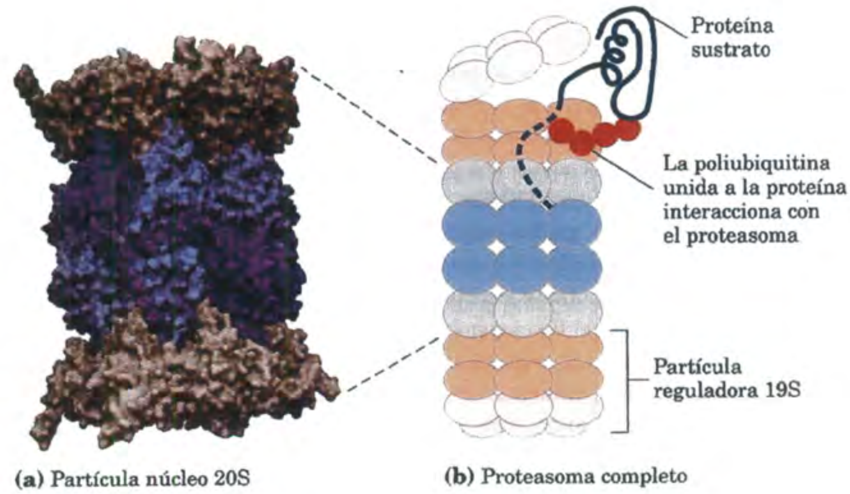


FIGURA 27–48 Estructura tridimensional de un proteasoma eucariótico. El proteasoma 26S está muy conservado en todos los eucariotas. Los dos subcomplejos son la partícula núcleo 20S y la partícula reguladora 19S. **(a)** (PDB ID 1IRU) La partícula núcleo consiste en cuatro anillos que forman una estructura en forma de barril. Cada uno de los anillos interiores tiene siete subunidades *β* diferentes (azul claro), tres de las cuales tienen actividad proteasa (azul oscuro). Los anillos exteriores constan de siete subunidades *β* (gris). **(b)** Una partícula reguladora forma un casquete en cada extremo de la partícula núcleo. La particula núcleo está coloreada como en **(a)**. Los segmentos de la base y la tapa de cada partícula reguladora se muestran en diferentes tonos de rosa. La partícula reguladora despliega las proteínas ubiquitinadas (azul) y las transloca al interior de la partícula núcleo, tal como se muestra.

TABLA 27–9 Relación entre la vida media de una proteína y su aminoácido amino-terminal

Residuo amino-terminal	Vida media*
Estabilizantes	
Met, Gly, Ala, Ser, Thr, Val	>20 h
Desestabilizantes	
Ile, Gln	~30 min
Tyr, Glu	~10 min
Pro	~7 min
Leu, Phe, Asp, Lys	~3 min
Arg	~2 min

Fuente: Modificado de Bachmair, A., Finley, D., & Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179–186.

*Las vidas medias se midieron para la proteína β-galactosidasa de levadura, que se modificó para que en cada experimento tuviese un residuo amino-terminal diferente. Las vidas medias pueden variar para proteínas diferentes y en organismos diferentes, pero parece que este patrón general sirve para todos los organismos.

eficazmente complementado con complejos reguladores que cambian con las condiciones celulares.

Aunque no se conocen todavía todas las señales que desencadenan la ubiquitinación, ya se ha identificado una. El residuo amino-terminal, que permanece después de eliminar el residuo Met amino-terminal o de cualquier otra modificación proteolítica del extremo amino-terminal, tiene una influencia profunda sobre la vida media de muchas proteínas (Tabla 27–9). Estas señales amino-terminales se han conservado durante miles de millones de años de evolución; las señales son las mismas en los sistemas de degradación de proteínas bacterianos y en la ruta humana de ubiquitinación. Señales más complejas, como por ejemplo la caja de destrucción, discutida en el Capítulo 12 (véase la Fig. 12–46), están siendo estudiadas.

La proteólisis dependiente de ubiquitina es tan importante para la regulación de procesos celulares como para la eliminación de las proteínas defectuosas. Muchas proteínas requeridas en una sola fase del ciclo celular eucariótico son rápidamente degradadas por la ruta dependiente de ubiquitina una vez han cumplido su función. La destrucción de la ciclina dependiente de ubiquitina es esencial en la regulación del ciclo celular (véase la Fig. 12–46).

Los componentes E2 y E3 de la ruta de ubiquitinación (Fig. 27–47) son, de hecho, dos grandes familias de proteínas. Enzimas E2 y E3 diferentes muestran diferentes especificidades por sus proteínas diana y de esta forma regulan diferentes procesos celulares. Algunos enzimas E2 y E3 están muy localizados en ciertos compartimientos celulares, como reflejo de su función especializada.

No es sorprendente que los defectos en las rutas de ubiquitinización estén detrás de numerosos estados patológicos. La incapacidad de degradar ciertas proteínas que activan la división celular (los productos de los oncogenes) puede llevar a la formación de tumores, mientras que una degradación demasiado rápida de proteínas supresoras de tumores puede tener el mismo efecto. La degradación ineficiente o demasiado rápida de las proteínas celulares también parece jugar un papel en otras situaciones: enfermedades renales, asma, enfermedades neurodegenerativas tales como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (asociadas con la formación de estructuras proteináceas características en las neuronas), fibrosis quística (debida en algunos casos a una degradación demasiado rápida de un canal iónico de cloruro con la consiguiente pérdida de función; véase el Recuadro 11–3), el síndrome de Liddle (en el que no se degrada un canal de sodio del riñón, lo que tiene como consecuencia la absorción excesiva de Na^+ y la aparición temprana de hipertensión) y muchas otras enfermedades. Se están diseñando medicamentos destinados a inhibir la función del proteasoma como tratamiento potencial para algunas de estas enfermedades.

En un entorno metabólico cambiante, la degradación de proteínas es tan importante para la supervivencia celular como la síntesis de proteínas, quedando mucho por aprender acerca de estas interesantes rutas. ■

RESUMEN 27.3 Destino y degradación de las proteínas

- Después de la síntesis, muchas proteínas se dirigen a localizaciones particulares en la célula. Un mecanismo de destino está basado en una secuencia péptido señal, por lo general localizada en el extremo amino-terminal de la proteína recién sintetizada.
- En las células eucarióticas, una clase de secuencia señal es reconocida por la partícula de reconocimiento de señal (SRP), que se une a la secuencia señal tan pronto como ésta aparece en el ribosoma, y transfiere el ribosoma entero y el polipéptido incompleto al RE. Los polipéptidos con estas secuencias señal son transferidos a la luz del RE a medida que se sintetizan, donde pueden ser modificados o transferidos al complejo de Golgi, para ser clasificados y enviados a los lisosomas, a la membrana plasmática o a vesículas de transporte.
- Las proteínas destinadas a las mitiocondrias y a los cloroplastos en las células eucarióticas y las destinadas a la exportación en las bacterias también utilizan una secuencia señal amino-terminal.
- Las proteínas destinadas al núcleo tienen una secuencia señal interna que, a diferencia de las otras secuencias señal, no es cortada una vez la proteína ha alcanzado su destino.
- Algunas células eucarióticas importan proteínas mediante endocitosis facilitada por receptor.
- Todas las células acaban degradando sus proteínas mediante sistemas proteolíticos especializados. Las proteínas defectuosas y las que están sometidas a recambio rápido son degradadas por un sistema dependiente de ATP. En las células eucarióticas, las proteínas se marcan primero por unión a ubiquitina, una proteína muy conservada. La proteólisis dependiente de ubiquitina tiene lugar en proteasomas, también muy conservados, y es fundamental en la regulación de muchos procesos celulares.

Palabras clave

Los términos en negrita se definen en el glosario.

aminoacil-tRNA 1066
aminoacil-tRNA sintetasas 1066
traducción 1066
codón 1066
marco de lectura 1067
codón de inicio 1069
codones de terminación 1069
marco de lectura abierto (ORF) 1069
anticodón 1070
balanceo 1072
desplazamiento del marco de traducción 1072
edición de RNA 1073
inicio 1088
secuencia Shine-Dalgano 1088
sitio aminoacilo (A) 1089
sitio peptidilo (P) 1089
sitio de salida (E) 1089
complejo de inicio 1089
elongación 1091
factores de elongación 1091
peptidil transferasa 1091
translocación 1091
supresor sin sentido 1094
terminación 1094
factores de liberación 1094
polisoma 1095
modificación postraducción 1096
puromicina 1098
tetraciclinas 1098
cloranfenicol 1098
cicloheximida 1098
estreptomicina 1098
toxina diftérica 1098
ricina 1099
secuencia señal 1100
partícula de reconocimiento de la señal (SRP) 1100
complejo de translocación de péptidos 1101
tunicamicina 1102
secuencia de localización nuclear (NLS) 1104
cavidades recubiertas 1106
clatrina 1106
dinamina 1106
ubiquitina 1107
proteasoma 1108

Bibliografía

El código genético

Ambrogelly, A., Palioura, S., & Söll, D. (2007) Natural expansion of the genetic code. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 29–35.

Blanc, V. & Davidson, N.O. (2003) C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. *J. Biol. Chem.* **278**, 1395–1398.

Crick, F.H.C. (1966) The genetic code: III. *Sci. Am.* **215** (Octubre), 55–62.

Una revisión penetrante del código genético, contemporánea del esclarecimiento de las palabras del código.

Hohn, M.J., Park, H.S., O'Donoghue, P., Schnitzbauer, M., & Söll, D. (2006) Emergence of the universal genetic code imprinted in an RNA record. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18,095–18,100.

Klobutcher, L.A. & Farabaugh, P.J. (2002) Shifty ciliates: frequent programmed translational frameshifting in Euplotids. *Cell* **111**, 763–766.

Levanon, K., Eisenberg E., Rechavi G., & Levanon, E.Y. (2005) Letter from the editor: adenosine-to-inosine RNA editing in Alu repeats in the human genome. *EMBO Rep.* **6**, 831–835.

Maas, S., Rich, A., & Nishikura, K. (2003) A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. *J. Biol. Chem.* **278**, 1391–1394.

Neeman, Y., Dahary, D., & Nishikura, K. (2006) Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 919–931.

Nirenberg, M. (2004) Historical review: deciphering the genetic code—a personal account. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 46–54.

Schimmel, P. & Beebe, K. (2004) Molecular biology—genetic code seizes pyrrolysine. *Nature* **431**, 257–258.

Stadtman, T.C. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 83–100.

Vetsigian, K., Woese, C., & Goldenfeld, N. (2006) Collective evolution and the genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10,696–10,701.

Xie, J.M. & Schultz, P.G. (2006) Innovation: a chemical toolkit for proteins—an expanded genetic code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 775–782.

Yanofsky, C. (2007) Establishing the triplet nature of the genetic code. *Cell* **128**, 815–818.

Yarus, M., Caporaso, J.G., & Knight, R. (2005) Origins of the genetic code: the escaped triplet theory. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 179–198.

Síntesis proteica

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., & Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 angstrom resolution. *Science* **289**, 905–920.

La primera estructura a alta resolución de una subunidad ribosómica mayor.

Björk, G.R., Ericson, J.U., Gustafsson, C.E.D., Hagervall, T.G., Jönsson, Y.H., & Wikström, P.M. (1987) Transfer RNA modification. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 263–288.

Chapeville, F., Lipmann, F., von Ehrenstein, G., Weisblum, B., Ray, W.J., Jr., & Benzer, S. (1962) On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1086–1092.

Experimentos clásicos que aportaron la prueba de la hipótesis del adaptador de Crick y que demostraron que los aminoácidos no se comprueban una vez unidos a los tRNA.

Dintzis, H.M. (1961) Assembly of the peptide chains of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 247–261.

Experimento clásico que estableció que las proteínas se sintetizan empezando por el extremo amino.

Giege, R., Sissler, M., & Florentz, C. (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acid Res.* **26**, 5017–5035.

Gray, N.K. & Wickens, M. (1998) Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 399–458.

Ibba, M. & Söll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 617–650.

Kapp, L.D. & Lorsch, J.R. (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 657–704.

Korostelev, A., Trakhanov, S., Laurberg, M., & Noller, H.F. (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell* **126**, 1065–1077.

Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2003) The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 813–850.

Peske, F., Rodnina, M.V., & Wintermeyer, W. (2005) Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Mol. Cell* **18**, 403–412.

Poehlsgaard, J. & Douthwaite, S. (2005) The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 870–881.

Rodnina, M.V. & Wintermeyer, W. (2001) Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 415–435.

Woese, C.R., Olsen, G.J., Ibba, M., & Söll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 202–236.

Destino y secreción de proteínas

DeMartino, G.N. & Gillette, T.G. (2007) Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* **129**, 659–662.

Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., & Gordon C. (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 26–31.

Higgins, M.K. & McMahon, H.T. (2002) Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 257–263.

Liu, C.W., Li, X.H., Thompson, D., Wooding, K., Chang, T., Tang, Z., Yu, H., Thomas, P.J., & DeMartino, G.N. (2006) ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Mol. Cell* **24**, 39–50.

Luzio, J.P., Pryor, P.R., & Bright, N.A. (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 622–632.

Mayor, S. & Pagano, R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603–612.

Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 863–917.

Pickart, C.M. & Cohen, R.E. (2004) Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 177–187.

Royle, S.J. (2006) The cellular functions of clathrin. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1823–1832.

Schatz, G. & Dobberstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519–1525.

Schekman, R. (2007) How sterols regulate protein sorting and traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 6496–6497.

Smalle, J. & Vierstra, R.D. (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 555–590.

Stewart, M. (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 195–208.

Problemas

1. Traducción del RNA mensajero Proponga las secuencias de aminoácidos de los péptidos formados por los ribosomas en respuesta a las siguientes secuencias de mRNA, suponiendo que el marco de lectura empieza con las tres primeras bases de cada secuencia.

(a) GGUCAGUCGCUCCUGAUU
(b) UUGGAUGCGCCAUAAUUUGCU
(c) CAUGAUGCCUGUUGCUAC
(d) AUGGACGAA

2. ¿Cuántas secuencias de mRNA diferentes pueden especificar una secuencia de aminoácidos? Escriba todas las secuencias posibles de mRNA que pueden codificar el tripéptido sencillo Leu–Met–Tyr. Su respuesta le dará una idea del número de mRNA posibles que pueden codificar un polipéptido.

3. ¿Puede predecirse la secuencia de bases de un mRNA a partir de la secuencia de aminoácidos de su producto polipeptídico? Una secuencia de bases dada de un mRNA codifica una sola secuencia de aminoácidos de un polipéptido, si se especifica el marco de lectura. A partir de una secuencia dada de residuos aminoácidos de una proteína como el citocromo *c*, ¿podemos predecir la secuencia de bases de un mRNA único que la codifique? Exponga las razones de su respuesta.

4. Codificación de un polipéptido por un DNA dúplex La hebra molde de un segmento de DNA de doble cadena contiene la secuencia

(5′)CTTAACACCCCTGACTTCGCGCCGTCG(3′)

(a) ¿Cuál es la secuencia de bases del mRNA que puede ser transcrito a partir de esta hebra?

(b) ¿Qué secuencia de aminoácidos podría ser codificada por el mRNA de (a) empezando desde el extremo 5′?

(c) Si la hebra complementaria (no molde) de este DNA fuese transcrita y traducida, ¿la secuencia de aminoácidos resultante sería la misma que en (b)? Explique el significado biológico de su respuesta.

5. La metionina tiene un solo codón La metionina es uno de los dos aminoácidos que tiene un solo codón. ¿De qué modo el único codón de la metionina puede especificar tanto el residuo de inicio como los residuos Met interiores en los polipéptidos sintetizados por *E. coli*?

6. mRNA sintéticos El código genético fue descifrado con polirribonucleótidos sintetizados tanto enzimática como químicamente en el laboratorio. A partir de lo que ahora sabemos del código genético, ¿cómo diseñaría un polirribonucleótido que actuaría de mRNA codificando predominantemente residuos Phe y un pequeño número de residuos Leu y Ser? ¿Qué otro u otros aminoácidos serían codificados por este polirribonucleótido, aunque en menor proporción?

7. Coste energético de la biosíntesis de proteínas Determine el coste energético mínimo, en términos de equivalentes de ATP consumidos, que se requieren para la biosíntesis de la cadena de β-globina de la hemoglobina (146 residuos), partiendo de una mezcla que contenga todos los aminoácidos necesarios, ATP y GTP. Compare su respuesta con el coste energético directo de la biosíntesis de una cadena lineal de glucógeno de 146 residuos de glucosa unidos por enlaces ($\alpha1\rightarrow4$), partiendo de una mezcla que incluya glucosa, UTP y ATP (Capítulo 15). A partir de sus datos, ¿cuál es el coste energético *extra* de sintetizar una proteína, en la que todos los residuos estén ordenados en una secuencia específica, comparado con el coste de sintetizar un polisacárido que contenga el mismo número de residuos, pero que carezca de la información contenida en la proteína?

Además del coste energético directo de la síntesis de una proteína, hay costes indirectos: los requeridos para que la célula fabrique los enzimas necesarios para la síntesis proteica. Compare la magnitud de los costes indirectos para una célula eucariótica de la biosíntesis de cadenas lineales ($\alpha1\rightarrow4$) de glucógeno y de la biosíntesis de polipéptidos, en función de la maquinaria enzimática implicada.

8. Predicción de anticodones a partir de codones La mayoría de aminoácidos tienen más de un codón y se unen a más de un tRNA, cada uno con un anticodón diferente. Escriba todos los anticodones posibles para los cuatro codones de la glicina: (5′)GGU, GGC, GGA y GGG.

(a) De su respuesta, ¿qué posiciones en los anticodones son determinantes primarios de su especificidad de codón en el caso de la glicina?

(b) De estos apareamientos anticodón-codón, ¿cuáles tienen un par de bases con balanceo?

(c) ¿Qué apareamientos anticodón-codón tienen en las tres posiciones puentes de hidrógeno fuertes tipo Watson-Crick?

9. Efecto del cambio de una sola base sobre la secuencia de aminoácidos Muchas pruebas confirmatorias importantes sobre el código genético provienen de la evaluación de los cambios en la secuencia de aminoácidos de proteínas mutantes después del cambio de una sola base en el gen que codifica la proteína. ¿Cuáles de los siguientes reemplazamientos de un

aminoácido serían provocados por el cambio de una única base? ¿Cuáles no pueden ser el resultado de mutaciones en una sola base? ¿Por qué?

(a) Phe→Leu
(b) Lys→Ala
(c) Ala→Thr
(d) Phe→Lys
(e) Ile→Leu
(f) His→Glu
(g) Pro→Ser

10. Causa de la mutación de la célula falciforme En la hemoglobina de la célula falciforme hay un residuo Val en la posición 6 de la cadena de la β-globina en lugar del residuo Glu encontrado en esta posición en la hemoglobina A normal. ¿Puede predecir qué cambio tuvo lugar en el codón del glutamato en el DNA que justifique su sustitución por Val?

11. Corrección de pruebas por las aminoacil-tRNA sintetasas La isoleucil-tRNA sintetasa posee una función de corrección de pruebas que asegura la fidelidad de la reacción de aminoacilación, pero la histidil-tRNA sintetasa carece de esta función de corrección de pruebas. Explíquelo.

12. Importancia del "segundo código genético" Algunas aminoacil-tRNA sintetasas no reconocen ni unen el anticodón de sus tRNA afines, sino que utilizan otros rasgos estructurales de los tRNA para lograr la especificidad de fijación. Los tRNA de la alanina pertenecen aparentemente a esta categoría.

(a) ¿Qué características del $tRNA^{Ala}$ son reconocidas por la Ala-tRNA sintetasa?

(b) Describa las consecuencias de una mutación C→G en la tercera posición del anticodón del $tRNA^{Ala}$.

(c) ¿Qué otros tipos de mutaciones pueden tener efectos similares?

(d) Mutaciones de estos tipos no se encuentran nunca en poblaciones naturales de organismos. ¿Por qué? (Pista: Considere lo que podría suceder tanto a las proteínas individuales como al organismo en su conjunto.)

13. Mantenimiento de la fidelidad de la síntesis de proteínas Los mecanismos químicos utilizados para evitar errores en la síntesis de proteínas son diferentes de los utilizados durante la replicación del DNA. Las DNA polimerasas utilizan una actividad exonucleasa 3'→5' correctora de pruebas para eliminar nucleótidos mal apareados, incorrectamente incorporados en una cadena de DNA en crecimiento. No existe una función correctora de pruebas equivalente en los ribosomas y, de hecho, las identidades de los aminoácidos unidos al tRNA entrante que son añadidos al polipéptido en crecimiento nunca se comprueban. Un paso de corrección de pruebas que hidrolizase el último enlace peptídico formado cuando se hubiese incorporado un aminoácido incorrecto en un polipéptido en crecimiento (análogo al paso de corrección de pruebas de las DNA polimerasas) sería poco práctico. ¿Por qué? (Pista: Considere cómo se mantiene la unión entre el polipéptido en crecimiento y el mRNA durante la elongación; véanse las Figs. 27–29 y 27–30).

14. Predicción de la localización celular de una proteína El gen de un polipéptido eucariótico de 300 residuos aminoácidos es alterado para que una secuencia señal reconocida por la SRP se encuentre en el extremo amino del polipéptido y una señal de reconocimiento nuclear (NLS) se encuentre en el interior, con inicio en el residuo 150. ¿Dónde es probable que se encuentre la proteína en la célula?

15. Requerimientos para la translocación de proteínas a través de una membrana La proteína de secreción bacteriana OmpA tiene un precursor, ProOmpA, que posee la secuencia señal amino-terminal necesaria para la secreción. Si ProOmpA purificada se desnaturaliza con urea 8 M y a continuación se elimina la urea (por ejemplo, pasando la disolución de proteína rápidamente a través de una columna de filtración en gel), la proteína puede ser translocada in vitro a través de membranas bacterianas internas aisladas. Sin embargo, la translocación no sucede si ProOmpA es incubada durante varias horas en ausencia de urea. Además, la capacidad de translocación se mantiene durante largo tiempo si ProOmpA es incubada en presencia de otra proteína bacteriana denominada factor desencadenante. Describa la probable función de este factor.

16. Capacidad de codificación de proteínas de un DNA vírico El genoma de 5.386 pb del bacteriófago ϕX174 contiene genes para 10 proteínas, designadas A a K, cuyos tamaños están indicados en la tabla. ¿Cuánto DNA sería necesario para codificar estas 10 proteínas? ¿Cómo puede reconciliar el tamaño del genoma de ϕX174 con su capacidad de codificación?

Proteína	Número de residuos aminoácidos	Proteína	Número de residuos aminoácidos
A	455	F	427
B	120	G	175
C	86	H	328
D	152	J	38
E	91	K	56

Problema de análisis de datos

17. Diseño de proteínas mediante genes generados al azar Los estudios acerca de la secuencia de aminoácidos y de las correspondientes estructuras tridimensionales de proteínas de tipo salvaje o mutantes han generado importantes conocimientos sobre los principios que gobiernan el plegamiento de las proteínas. Una manera de comprobar la validez de estos conocimientos consistiría en *diseñar* una proteína de acuerdo con estos principios y ver si ésta se pliega como sería de esperar.

Kamtekar y colaboradores (1993) aprovecharon determinadas propiedades del código genético para generar secuencias de proteínas al azar con patrones definidos de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos. Su diseño combinaba conocimientos de estructura de proteínas, de las propiedades de los aminoácidos y del código genético para explorar los factores que influyen en la estructura de las proteínas.

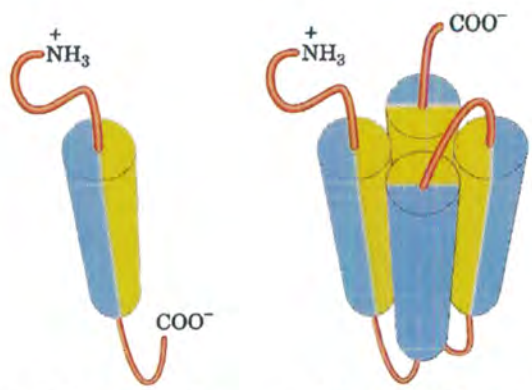
Se propusieron generar un conjunto de proteínas con la simple estructura de haz de cuatro hélices mostrada en la parte superior de la página 1113 (derecha), con las hélices α (representadas por cilindros) conectados por segmentos en ovillo estadístico (rosa). Todas las hélices α son anfipáticas: los grupos R de un lado de la hélice son exclusivamente hidrofóbicos (amarillo) y los del otro hidrofílicos (azul). Una proteína formada por cuatro de estas hélices separadas por cortos segmentos de ovillo estadístico debería plegarse de forma que las caras hidrofílicas de las hélices se orientaran hacia el disolvente.

(a) ¿Qué fuerzas o interacciones mantienen unidas las cuatro hélices α en el haz?

La Figura 4–4a muestra un segmento de hélice α de diez residuos aminoácidos. Con el cilindro gris central como divisor, cuatro de los grupos R (esferas púrpura) se extienden desde el lado izquierdo de la hélice y seis desde el lado derecho.

(b) Numere los grupos R de la Figura 4–4a de arriba (amino terminal; 1) a abajo (carboxilo terminal; 10). ¿Qué grupos R se extienden desde el lado izquierdo y cuáles desde el derecho?

(c) Suponga que quisiera diseñar una hélice antipática de 10 aminoácidos, con el lado izquierdo hidrofílico y el lado derecho hidrofóbico. Dé una secuencia de 10 aminoácidos que potencialmente pudiera plegarse de este modo. Existen muchas respuestas correctas posibles.



Una hélice α anfipática **Haz de cuatro hélices**

(d) Proponga una posible secuencia de DNA de doble cadena que pudiera codificar la secuencia de aminoácidos elegida (c). (Se trata de una región interna de la proteína, por lo tanto no es necesario incluir codones de inicio y de paro.)

En lugar de diseñar proteínas de secuencia específica, Kamtekar y colaboradores diseñaron proteínas de secuencia parcialmente al azar, con aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos dispuestos en un patrón controlado. Para ello aprovecharon algunas interesantes propiedades del código genético para construir una genoteca de moléculas de DNA sintéticas de secuencia parcialmente al azar y un determinado patrón.

Para diseñar una secuencia de DNA que codificara secuencias de aminoácidos hidrofóbicos al azar comenzaron con el codón degenerado NTN, donde N puede ser A, G, C o T. Rellenaron cada posición N con una mezcla equimolecular de A, G, C y T en la reacción de síntesis de DNA para generar una mezcla de moléculas de DNA con diferentes nucleótidos en esta posición (véase la Fig. 8–35). Del mismo modo, para codificar secuencias de aminoácidos hidrofílicos al azar, utilizaron el codón degenerado NAN con una mezcla equimolar de A, G y C (pero en este caso sin T) para rellenar las posiciones N.

(e) ¿Qué aminoácidos pueden ser codificados por el triplete NTN? ¿Son hidrofóbicos todos los aminoácidos de este grupo? ¿Incluye este grupo *todos* los aminoácidos hidrofóbicos?

(f) ¿Qué aminoácidos pueden ser codificados por el triplete NAN? ¿Son todos polares? ¿Incluye este grupo *todos* los aminoácidos polares?

(g) En la síntesis de los codones NAN ¿por qué fue necesario omitir la T de la mezcla de reacción?

Kamtekar y colaboradores clonaron esta genoteca de secuencias de DNA al azar en plásmidos, seleccionaron 48 que produjeron el patrón correcto de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos y los expresaron en *E. coli*. El siguiente paso consistió en determinar si las proteínas se plegaban como estaba previsto. Hubiese sido muy laborioso expresar cada una de las proteínas, cristalizarla y determinar su estructura tridimensional completa. En su lugar, se utilizó la maquinaria de maduración de proteínas de *E. coli* para descartar las secuencias que daban lugar a proteínas muy defectuosas. En este escrutinio inicial, conservaron solamente los clones que daban una banda de proteína de la masa molecular esperada en geles de poliacrilamida con SDS (véase la Fig. 3–18).

(h) ¿Por qué una proteína muy mal plegada no producía una banda de la masa molecular esperada en la electroforesis?

Varias proteínas superaron este ensayo inicial, y el examen posterior mostró que poseían la estructura de cuatro hélices esperada.

(i) ¿Por qué no todas las proteínas con secuencia al azar que pasaron el escrutinio inicial contenían la estructura de cuatro hélices?

Referencia

Kamtekar, S., Schiffer, J.M., Xiong, H., Babik, J.M., & Hecht, M.H. (1993) Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* **262**, 1680–1685.

El problema fundamental de la química fisiológica y de la embriología es comprender por qué todas las células de los tejidos no expresan en todo momento todas las potencialidades inherentes a su genoma.

—*François Jacob y Jacques Monod, artículo en* Journal of Molecular Biology, *1961*

28

Regulación de la expresión génica

De los aproximadamente 4.000 genes presentes en un genoma bacteriano típico o de los 29.000 genes estimados del genoma humano, solamente se expresa una fracción en una célula determinada y en un momento dado. Algunos productos génicos están presentes en cantidades muy grandes: los factores de elongación requeridos para la síntesis proteica, por ejemplo, se encuentran entre las proteínas más abundantes de las bacterias, y la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) de las plantas y bacterias fotosintéticas es el enzima conocido más abundante en la biosfera. Otros productos génicos se encuentran en cantidades mucho menores; por ejemplo, una célula puede contener solamente unas pocas moléculas de los enzimas que reparan lesiones del DNA poco frecuentes. Las necesidades de algunos productos génicos cambian a lo largo del tiempo. Los requerimientos de enzimas en ciertas vías metabólicas pueden aumentar o disminuir en función de los cambios en la disponibilidad de nutrientes. Durante el desarrollo de un organismo multicelular, algunas proteínas que influyen en la diferenciación celular están presentes solamente un breve lapso de tiempo y en unas pocas células. La especialización de la función celular puede influir profundamente en las necesidades de varios productos génicos; un ejemplo es la elevada concentración de una sola proteína, la hemoglobina en los eritrocitos. Dado el elevado coste de la síntesis de proteínas, la regulación de la expresión génica es esencial para conseguir una utilización óptima de la energía disponible.

La concentración celular de una proteína viene determinada por un delicado equilibrio entre siete procesos por lo menos, de los cuales cada uno tiene varios puntos potenciales de regulación:

1. Síntesis del transcrito primario de RNA (transcripción)
2. Modificación postranscripción del mRNA
3. Degradación del RNA mensajero
4. Síntesis proteica (traducción)
5. Modificaciones postraducción de las proteínas
6. Destino y transporte de las proteínas
7. Degradación de las proteínas

Estos procesos se resumen en la **Figura 28–1**. Hemos examinado varios de estos mecanismos en capítulos anteriores. La modificación postranscripción del mRNA mediante procesos tales como el corte y empalme alternativo (véase la Fig. 26–22) o la edición del RNA (véanse las Figs. 27–10 y 27–12) pueden determinar qué proteínas se producen a partir de los transcritos de mRNA y en qué cantidades. Diversas secuencias de nucleótidos en un mRNA pueden determinar la velocidad de su degradación (p. 1048). Muchos factores influyen en la velocidad de traducción de un mRNA a proteína, así como en la modificación postraducción de la proteína, su destino y finalmente su degradación (Capítulo 27).

De los procesos de regulación ilustrados en la Figura 28–1, aquellos que operan a nivel del inicio de la transcripción son los que están mejor documentados y son el objeto principal de este capítulo; también se consideran otros mecanismos. Continúan descubriéndose mecanismos de regulación complejos y a veces sorprendentes, que ponen de manifiesto la importancia de la regulación postranscripción y de la traducción, especialmente en los eucariotas. Los procesos de regulación de muchos genes son elaborados y redundantes y pueden implicar una inversión considerable de energía química.

El control del inicio de la transcripción permite la regulación sincronizada de múltiples genes que codifican productos con actividades interdependientes. Por ejemplo, cuando el DNA está gravemente dañado, las células bacterianas requieren un incremento coordinado de los niveles de muchos enzimas implicados en la reparación del DNA. Tal vez la forma más sofisticada de coordinación se dé en los complejos circuitos de regulación que gobiernan el desarrollo de los eucariotas multicelulares, los cuales pueden poner en juego muchos tipos de mecanismos reguladores.

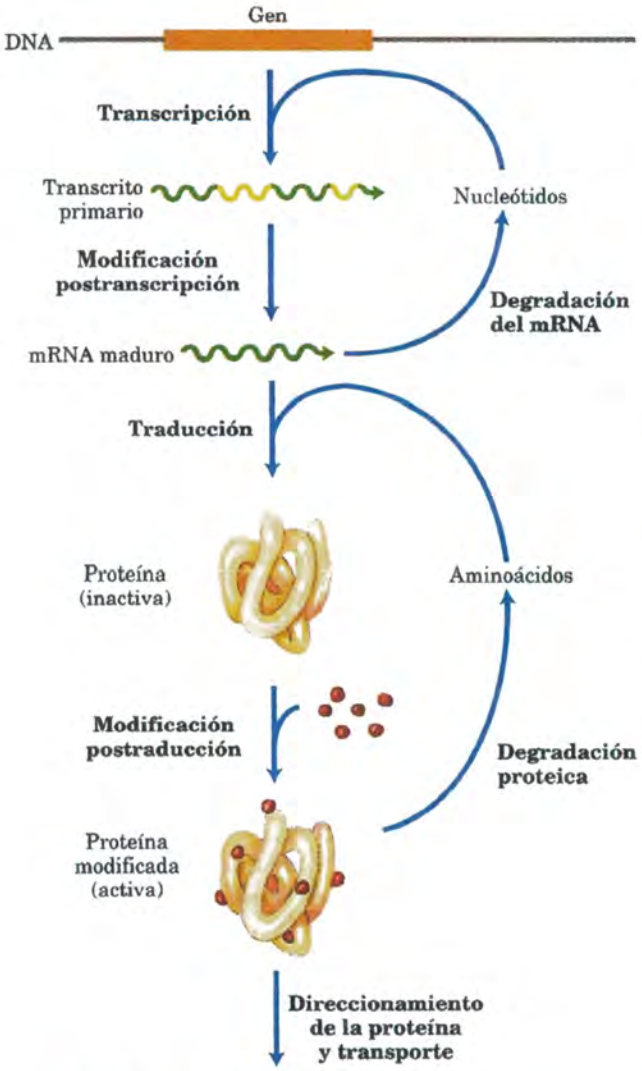


FIGURA 28–1 Siete procesos que afectan a la concentración estacionaria de una proteína. Cada proceso tiene diversos puntos de regulación potenciales.

Empezaremos examinando las interacciones entre proteínas y DNA que son la clave de la regulación transcripcional. Después examinaremos las proteínas específicas que influyen en la expresión de genes específicos, primero en bacterias y posteriormente en las células eucarióticas. En la discusión se proporciona información sobre la regulación postranscripción y de la traducción, cuando es necesaria para una mejor compresión de la amplia diversidad de mecanismos reguladores.

28.1 Principios de regulación génica

Los genes de los productos que se requieren en todo momento, tales como los de los enzimas de las rutas metabólicas centrales, se expresan en un nivel más o menos constante en prácticamente todas las células de una especie u organismo. Tales genes a menudo se designan como **genes constitutivos.** La expresión constante de un gen se denomina **expresión génica constitutiva.**

Los niveles celulares de otros productos génicos aumentan y disminuyen en respuesta a señales moleculares; ésa es la **expresión génica regulada**. Los productos génicos que aumentan de concentración bajo circunstancias moleculares particulares se designan como **inducibles;** el proceso de aumento de su expresión se denomina **inducción.** La expresión de muchos genes que codifican enzimas de reparación del DNA, por ejemplo, es inducida por un sistema de proteínas reguladoras que responden a altos niveles de lesiones en el DNA. Por el contrario, los productos génicos que disminuyen de concentración en respuesta a una señal molecular se designan como **reprimibles** y el proceso se denomina **represión.** Así por ejemplo, en las bacterias la abundancia de triptófano provoca la represión de los genes de los enzimas que catalizan la biosíntesis de triptófano.

La transcripción está facilitada y regulada por interacciones proteína–DNA, especialmente por aquellas en las que intervienen los componentes proteicos de la RNA polimerasa (Capítulo 26). Primero consideraremos cómo se regula la actividad de la RNA polimerasa y continuaremos con una descripción general de las proteínas que intervienen en esta regulación. Después examinaremos la base molecular del reconocimiento de secuencias específicas de DNA por proteínas de unión al DNA.

La RNA polimerasa se une al DNA en los promotores

Las RNA polimerasas se unen al DNA e inician la transcripción en los promotores (véase la Fig. 26–5), sitios generalmente cercanos a los puntos donde empieza la síntesis de RNA en el molde de DNA. La regulación del inicio de la transcripción a menudo comporta cambios en el modo como la RNA polimerasa interacciona con un promotor.

Las secuencias de nucleótidos de los promotores varían considerablemente, lo cual influye en la afinidad de la unión de las RNA polimerasas y, por tanto, en la frecuencia del inicio de la transcripción. Algunos genes de *Escherichia coli* se transcriben una vez por segundo, mientras que otros menos de una vez por generación celular. Esta variación se debe en buena parte a diferencias en la secuencia del promotor. En ausencia de proteínas reguladoras, las diferencias en las secuencias del promotor pueden afectar la frecuencia del inicio de la transcripción en un factor de más de 1000. La mayoría de los promotores de *E. coli* tienen una secuencia muy parecida a la secuencia consenso **(Fig. 28–2)**. Las mutaciones que los alejan de la secuencia consenso normalmente disminuyen la función de los promotores; por el contrario, las mutaciones que los acercan al consenso normalmente la potencian.

Las concentraciones celulares de las proteínas codificadas por los genes constitutivos varían ampliamente. Para estos genes, la interacción RNA polimerasa–promotor tiene una gran influencia en la tasa de inicio de la transcripción; diferencias en la secuencia del promotor permiten a la célula sintetizar el nivel apropiado de cada producto génico constitutivo.

La tasa basal de inicio de la transcripción en los promotores de genes no constitutivos también está determinada por la secuencia del promotor, pero, la expresión de estos genes está, además, modulada por proteínas reguladoras. Muchas de estas proteínas actúan potenciando o interfiriendo con la interacción entre la RNA polimerasa y el promotor.

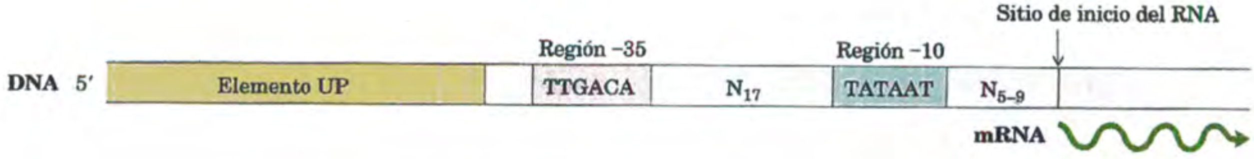


FIGURA 28–2 Secuencia consenso de muchos promotores de *E. coli*. La mayoría de las sustituciones de bases en las regiones −10 y −35 tienen un efecto negativo sobre la función del promotor. Algunos promotores también incluyen el elemento UP (promotor corriente arriba) (véase la Fig. 26–5). Por convención, las secuencias de DNA se muestran tal como se encuentran en la cadena codificante no molde, con el extremo 5′ a la izquierda. Los nucleótidos se numeran desde el sitio de inicio de la transcripción, con números positivos a la derecha (en la dirección de la transcripción) y números negativos a la izquierda. N indica cualquier nucleótido.

Las secuencias de los promotores eucarióticos son mucho más variables que las de sus equivalentes bacterianos (véase la Fig. 26–9). Las tres RNA polimerasas eucarióticas requieren normalmente una serie de factores de transcripción generales para unirse a un promotor. Sin embargo, al igual que en la expresión génica bacteriana, el nivel basal de transcripción está determinado por el efecto de las secuencias del promotor en la función de la RNA polimerasa y sus factores de transcripción asociados.

El inicio de la transcripción se regula mediante proteínas que se unen a los promotores o cerca de ellos

Al menos tres tipos de proteínas regulan el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa: los **factores de especificidad,** que modifican la especificidad de la RNA polimerasa por un promotor determinado o un conjunto de promotores; los **represores,** que impiden el acceso de la RNA polimerasa al promotor, y los **activadores,** que potencian la interacción RNA polimerasa–promotor.

Introdujimos los factores de especificidad bacterianos en el Capítulo 26 (véase la Fig. 26–5), aunque no los mencionamos con ese nombre. La subunidad σ del holoenzima de la RNA polimerasa de *E. coli* es un factor de especificidad que interviene en el reconocimiento y la unión al promotor. La mayoría de los promotores de *E. coli* son reconocidos por una única subunidad σ (M_r 70.000), denominada σ^{70}. En ciertas condiciones, algunas de las subunidades σ^{70} son reemplazadas por uno de otros seis factores de especificidad. Es destacable la sustitución de σ^{70} por σ^{32} (M_r 32.000) cuando las bacterias están sometidas a estrés por calor. Cuando está unida a σ^{32}, la RNA polimerasa se dirige hacia una serie de promotores especializados con una secuencia consenso diferente **(Fig. 28–3)**. Estos promotores controlan la expresión de un conjunto de genes que codifican proteínas, entre ellas algunas chaperonas de proteínas (p. 143) que son parte de la respuesta al choque térmico. Por tanto, la coordinación de la regulación de un conjunto de genes relacionados es el resultado de los cambios de afinidad de unión de la polimerasa, que la dirigen hacia diferentes promotores. En las células eucarióticas, algunos de los factores de transcripción generales, en particular la proteína de unión a TATA (TBP; véase la Fig. 26–9), pueden considerarse factores de especificidad.

Los represores se unen a sitios específicos del DNA. En células bacterianas, esos sitios de unión, denominados **operadores,** se encuentran generalmente cerca de un promotor. La unión de la RNA polimerasa, o su movimiento a lo largo del DNA después de la unión, se bloquea cuando el represor está presente. La regulación mediante una proteína represora que bloquea la transcripción se denomina **regulación negativa.** La unión del represor al DNA se regula por una señal molecular (o **efector**), normalmente una pequeña molécula o una proteína, que se une al represor y provoca un cambio de conformación. La interacción entre el represor y la molécula señal tanto puede aumentar como disminuir la transcripción. En algunos casos, el cambio de conformación provoca la disociación de un represor que se encuentra unido al DNA del operador **(Fig. 28–4a)**. El inicio de la transcripción puede entonces proceder libremente. En cambio, en otros casos la interacción entre un represor inactivo y la molécula señal hace que el represor se una al operador (Fig. 28–4b). En las células eucarióticas, el sitio de unión de un represor puede encontrarse a cierta distancia del promotor; la unión tiene el mismo efecto que en las células bacterianas: la inhibición del ensamblaje o de la actividad de un complejo de transcripción en el promotor.

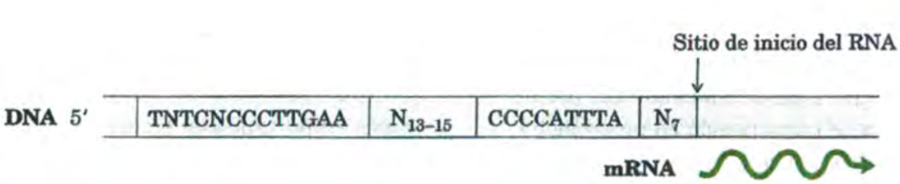


FIGURA 28–3 Secuencia consenso de los promotores que regulan la expresión de los genes del choque térmico de *E. coli*. Este sistema responde ante incrementos de temperatura y otras situaciones de estrés ambiental e implica la inducción de una serie de proteínas. La unión de la RNA polimerasa a los promotores del choque térmico se realiza mediante una subunidad σ especializada de la polimerasa, σ^{32}, que reemplaza a σ^{70} en el complejo de inicio de la RNA polimerasa.

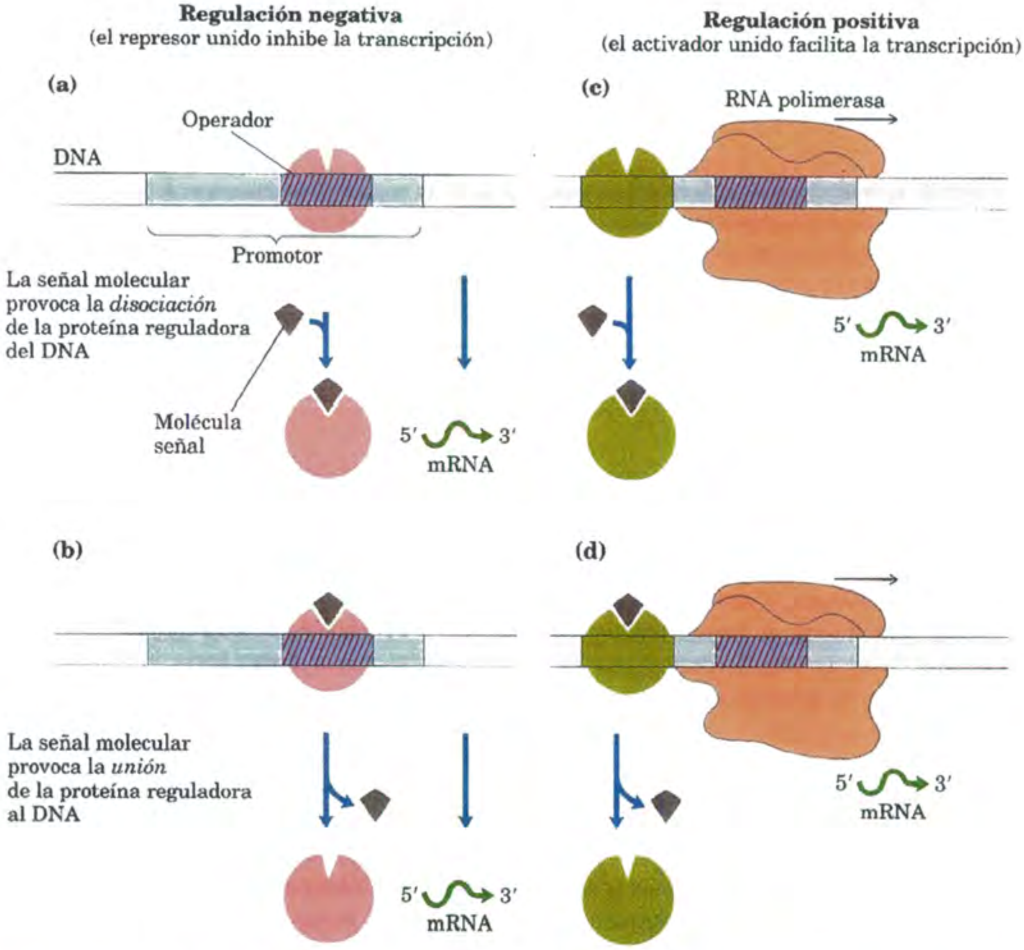


FIGURA 28–4 Patrones comunes de regulación del inicio de la transcripción. Se muestran dos tipos de regulación negativa. **(a)** El represor (en rosa) se une al operador en ausencia de la señal molecular; la señal externa provoca la disociación del represor que permite la transcripción. **(b)** El represor se une en presencia de la señal; el represor se disocia y la transcripción tiene lugar cuando se elimina la señal. La regulación positiva tiene lugar a través de activadores génicos. De nuevo se muestran dos modalidades. **(c)** El activador (en verde) se une en ausencia de la señal molecular y tiene lugar la transcripción; cuando se añade la señal, el activador se disocia y se inhibe la transcripción. **(d)** El activador se une en presencia de la señal; solamente se disocia cuando se elimina la señal. Observe que los términos regulación "positiva" y "negativa" se refieren al tipo de proteína reguladora implicada: la proteína unida facilita o inhibe la transcripción. En cualquiera de los casos, la presencia de la señal molecular puede aumentar o disminuir la transcripción, dependiendo de su efecto sobre la proteína reguladora.

Los activadores constituyen el contrapunto molecular de los represores; se unen al DNA y *potencian* la actividad de la RNA polimerasa en un promotor; es la **regulación positiva.** Los sitios de unión de los activadores se encuentran a menudo adyacentes a promotores a los que la RNA polimerasa o bien no se une por sí sola o lo hace débilmente, de manera que en ausencia de activador la trascripción es escasa. Algunos activadores eucarióticos se unen a sitios del DNA denominados potenciadores, que se encuentran lejos del promotor. Los potenciadores influyen en la tasa de transcripción en un promotor que puede estar situado a miles de pares de bases de distancia. Algunos activadores están normalmente unidos al DNA potenciando la transcripción hasta que la unión de una molécula señal provoca la disociación del activador (Fig. 28–4c). En otros casos, el activador se une al DNA sólo después de la interacción con una molécula señal (Fig. 28–4d). Las moléculas señal pueden, por tanto, aumentar o disminuir la transcripción según como afecten al activador. Tal como veremos la regulación positiva es muy común en los eucariotas.

La mayoría de los genes bacterianos están agrupados y se regulan en operones

El mecanismo general de las bacterias para coordinar la regulación de los genes que codifican productos implicados en una serie de procesos relacionadotes es de una gran sencillez: éstos genes están agrupados en el cromosoma y se transcriben juntos. Muchos mRNA procarióticos son policistrónicos —múltiples genes en un único transcrito— y el promotor único que inicia la transcripción del grupo es el sitio de regulación para la expresión de todos los genes del grupo. El grupo de genes y el promotor, más secuencias adicionales que funcionan conjuntamente en la regulación, se denominan **operón** **(Fig. 28–5)**. Es habitual que los operones incluyan de dos a

FIGURA 28–5 Un operón bacteriano representativo. Los genes A, B, y C se transcriben en un mRNA policistrónico. Las secuencias reguladoras típicas incluyen sitios de unión para proteínas que activan o reprimen la transcripción a partir del promotor.

François Jacob

Jacques Monod, 1910–1976

seis genes transcritos como una unidad; algunos operones contienen 20 o más genes.

Muchos de los principios de la expresión génica bacteriana fueron definidos por primera vez por los estudios del metabolismo de la lactosa en *E. coli*, que puede utilizar la lactosa como única fuente de carbono. En 1960, François Jacob y Jacques Monod publicaron un breve artículo en los *Comptes rendus* de la Academia Francesa de Ciencias que describía que dos genes adyacentes implicados en el metabolismo de la lactosa estaban regulados de forma coordinada por un elemento génico situado en un extremo del grupo de genes. Los genes eran los de la β-galactosidasa, que hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa, y la galactósido permeasa (lactosa permeasa, p. 402), que transporta la lactosa al interior de la célula (**Fig. 28–6**). Los términos "operón" y "operador" fueron introducidos por primera vez en este artículo. Con el modelo del operón, la regulación génica pudo, por primera vez, ser abordada en términos moleculares.

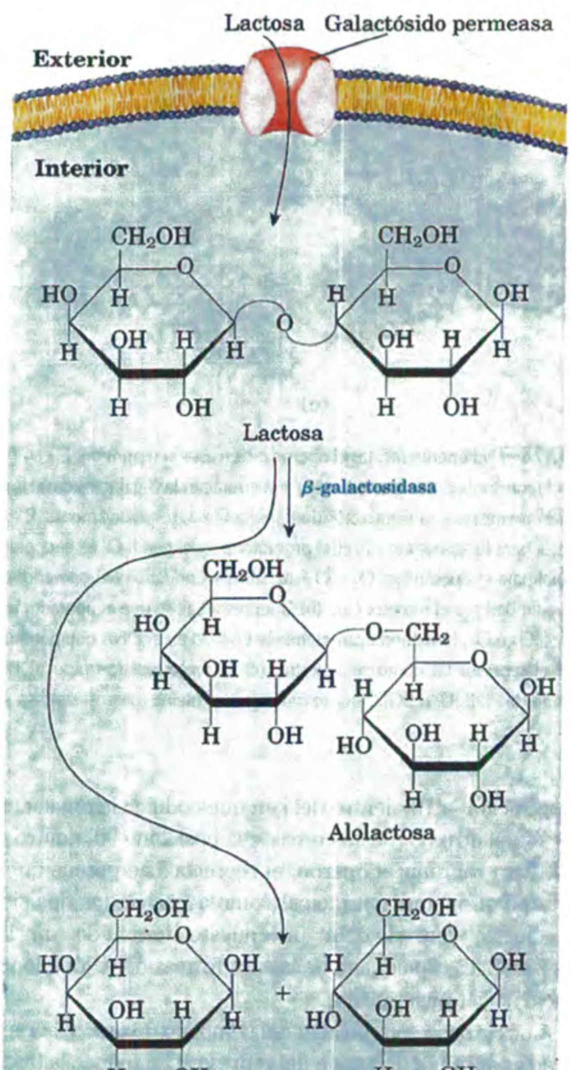


FIGURA 28–6 Metabolismo de la lactosa en *E. coli*. La captación y metabolismo de la lactosa requieren de las actividades de la galactósido (lactosa) permeasa y de la β-galactosidasa. La conversión de la lactosa en alolactosa mediante transglucosilación es una reacción minoritaria también catalizada por la β-galactosidasa.

El operon *lac* está sujeto a regulación negativa

El operón de la lactosa (*lac*) (**Fig. 28–7a**) incluye los genes de la β-galactosidasa (*Z*), la galactósido permeasa (*Y*) y la tiogalactósido transacetilasa (*A*). El último de estos enzimas parece modificar los galactósidos tóxicos para facilitar su eliminación por la célula. Cada uno de los tres genes está precedido por un sitio de unión a ribosomas (no mostrado en la Fig. 28–7), que dirige independientemente la traducción de cada gen (Capítulo 27). La regulación del operón *lac* sigue el modelo mostrado en la Figura 28–4a.

El estudio de los mutantes del operón *lac* ha revelado algunos detalles del funcionamiento del sistema de regulación del operón. En ausencia de lactosa, los genes del operón *lac* están reprimidos. Mutaciones en el operador o en otro gen, el gen *I*, provocan la síntesis constitutiva de los productos génicos. Cuando el gen *I* es defectuoso, la represión puede restablecerse mediante la introducción de un gen *I* funcional dentro de la célula en otra molécula de DNA, lo que demuestra que el gen *I* codifica una molécula que difunde causando la represión génica. Se demostró que esta molécula era una proteína, ahora denominada represor Lac, un tetrámero de monómeros idénticos. El operador al que se une más fuertemente (O_1) es contiguo al sitio de inicio de la transcripción (Fig. 28–7a). El gen *I* se transcribe a partir de su propio promotor (P_I), independientemente de los genes del operón *lac*. El operón *lac* tiene dos sitios de unión secundarios para el represor Lac. Uno (O_2) está centrado cerca

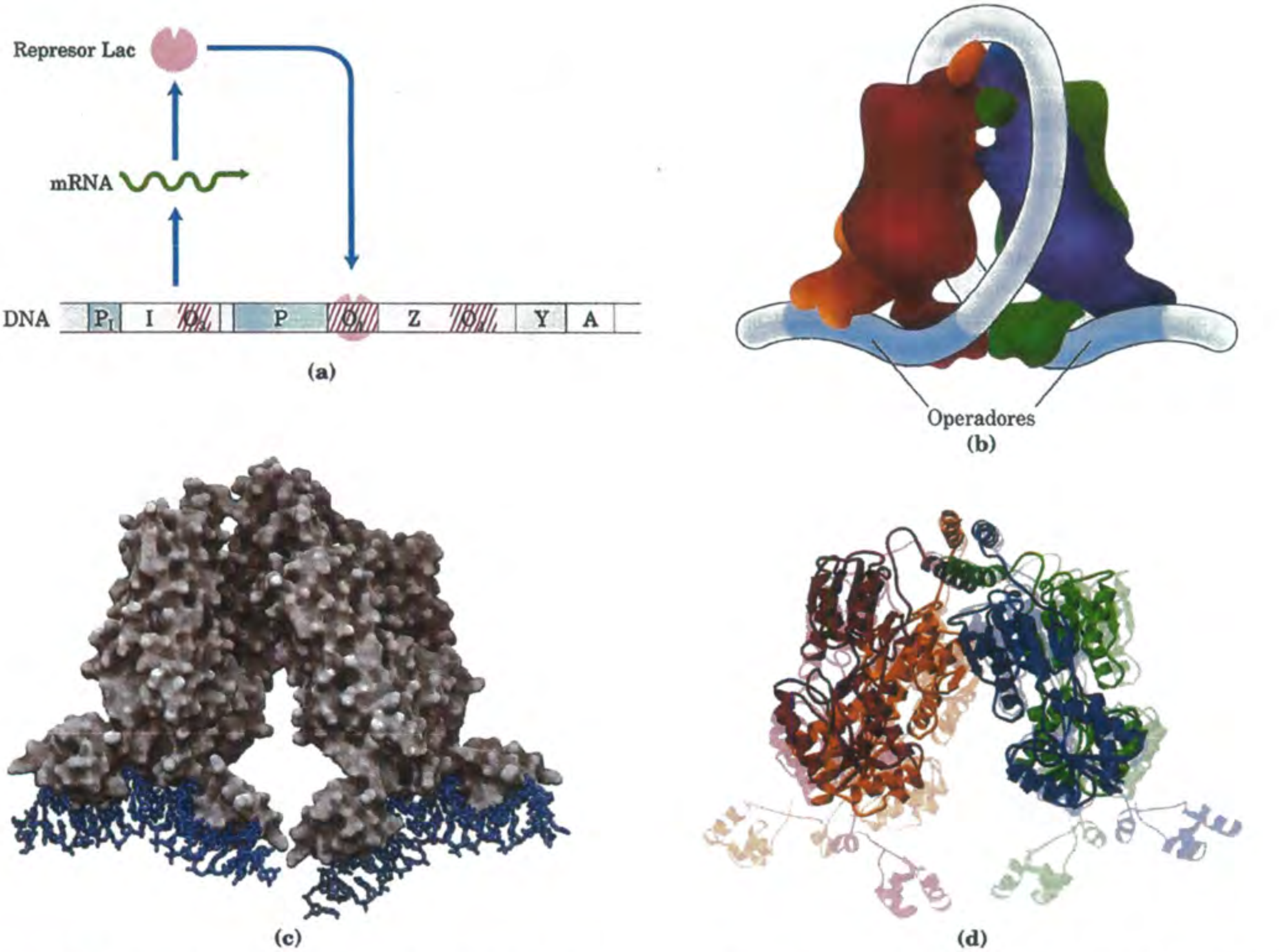


FIGURA 28–7 El operón *lac*. **(a)** El operón *lac* en estado reprimido. El gen *I* codifica el represor Lac. Los genes *lac Z*, *Y* y *A* codifican la β-galactosidasa, la galactósido permeasa y la tiogalactósido transacetilasa, respectivamente. P es el promotor para los genes *lac* y P_I es el promotor para el gen *I*. O_1 es el operador principal para el operón *lac*; O_2 y O_3 son sitios secundarios del operador con menor afinidad por el represor Lac. **(b)** El represor Lac se une al operador principal y a O_2 u O_3, formando aparentemente un lazo en el DNA que puede envolver el represor tal como se muestra. **(c)** El represor Lac unido al DNA (derivado de PDB ID 1LBG). Aquí se muestra la proteína (en gris) unida a segmentos cortos y discontinuos de DNA (en azul). **(d)** Cambio de conformación en el represor Lac provocado por la unión del inductor artificial isopropiltiogalactósido, IPTG (derivado de PDB ID 1LBH y 1LBG). La estructura del represor tetramérico se muestra sin IPTG unido (imagen transparente) y con IPTG unido (imagen sólida superpuesta; no se muestra el IPTG). El DNA unido en ausencia de IPTG (estructura transparente) no se muestra. Cuando el IPTG está unido y el DNA no está unido, los dominios de unión al DNA están demasiado distorsionados para ser visibles en la estructura del cristal.

de la posición +410, dentro del gen que codifica la β-galactosidasa (*Z*); el otro (O_3) está cerca de la posición –90, dentro del gen *I*. Para reprimir el operón, el represor Lac parece que se une tanto al operador principal como a uno de los dos sitios secundarios, con el DNA interpuesto formando un lazo (Fig. 28–7b, c). Cualquiera de las dos formas de unión bloquea el inicio de la transcripción.

A pesar de la complejidad del complejo de unión, la represión no es absoluta. La unión del represor Lac reduce la tasa de inicio de la transcripción en un factor de 10^3. Si se eliminan los sitios O_2 y O_3 por deleción o mutación, la unión del represor solamente a O_1 reduce la transcripición en un factor de alrededor de 10^2. Incluso en el estado reprimido, las células tienen unas pocas moléculas de β-galactosidasa y de galactósido permeasa, probablemente sintetizadas en las raras ocasiones en que el represor se disocia transitoriamente de los operadores. Este nivel basal de transcripción es esencial para la regulación del operón.

Cuando se suministra lactosa a las células, se induce el operón *lac*. Una molécula inductora (señal) se une a un sitio específico del represor Lac, causando un cambio de conformación (Fig. 28–7d), que provoca la disociación del represor del operador. El inductor en el sistema del operón *lac* no es la propia lactosa sino la alolactosa, un isómero de la lactosa (Fig. 28–6). Una vez en el interior de la célula de *E. coli* (mediante las pocas moléculas de permeasa existentes), la lactosa se convierte en alolactosa por una de las pocas moléculas de β-galactosidasa presentes. La liberación del represor Lac del operador, provocada por la unión de la alolactosa al represor, permite que los genes del operón *lac* se expresen y provoquen un incremento de 10^3 veces en la concentración de β-galactosidasa.

Varios β-galactósidos estructuralmente relacionados con la alolactosa son inductores del operón *lac*, pero no son sustratos de la β-galactosidasa; otros son sustratos pero no inductores. Un inductor muy efectivo y no metabolizable del operón

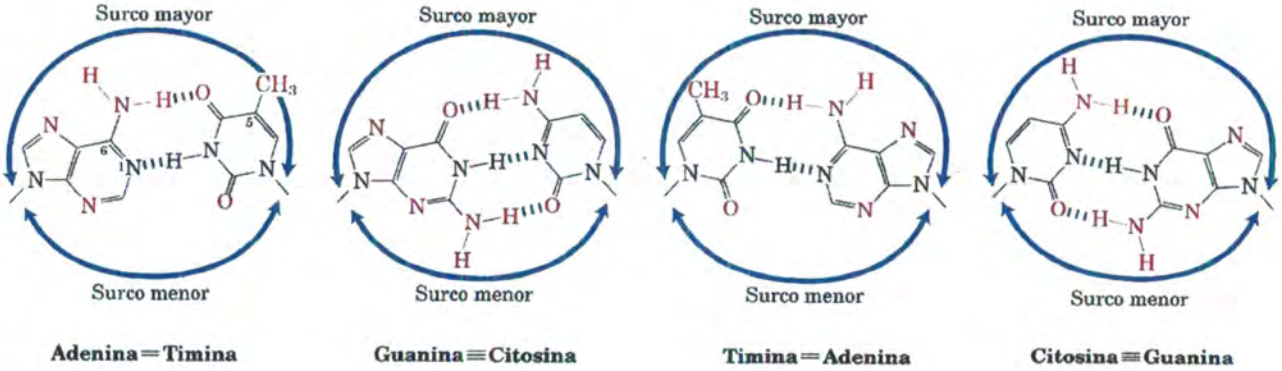
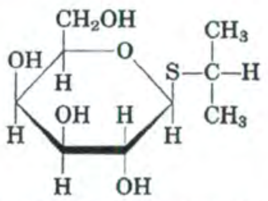


FIGURA 28–8 Grupos en el DNA disponibles para la unión de proteínas. Aquí se muestran los grupos funcionales de los cuatro pares de bases que están expuestos en los surcos mayor y menor del DNA (véase la Fig. 8–13). Los grupos que pueden ser utilizados en el reconocimiento de pares de bases por proteínas se muestran en rojo.

lac, que a menudo se utiliza experimentalmente, es el isopropiltiogalactósido (IPTG).



Isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG)

Un inductor que no se pueda metabolizar permite estudiar la función fisiológica de la lactosa como fuente de carbono para el crecimiento, con independencia de su función en la regulación de la expresión génica.

Además de la multitud de operones conocidos actualmente en bacterias, se han encontrado unos cuantos operones policistrónicos en células de eucariotas inferiores. En las células de eucariotas superiores, en cambio, casi todos los genes que codifican proteínas se transcriben separadamente.

El mecanismo de regulación de los operones puede diferir significativamente del sencillo modelo presentado en la Figura 28–7. Incluso el operón *lac* es más complejo de lo indicado aquí, ya que un activador también contribuye al esquema general, tal como veremos en la Sección 28.2. Antes de seguir con la discusión de los niveles de regulación de la expresión génica, examinaremos las interacciones moleculares fundamentales entre las proteínas que se unen al DNA (tales como represores y activadores) y las secuencias de DNA a las que se unen.

Las proteínas reguladoras tienen dominios discretos de unión al DNA

Las proteínas reguladoras generalmente se unen a secuencias de DNA específicas. Sus afinidades por estas secuencias diana son aproximadamente de 10^4 a 10^6 veces mayores que sus afinidades por cualquier otra secuencia de DNA. La mayoría de proteínas reguladoras tienen dominios discretos de unión al DNA que contienen subestructuras que interaccionan exacta y específicamente con el DNA. Estos dominios de unión por lo general incluyen uno o más grupos relativamente pequeños de motivos estructurales reconocibles y característicos.

Para unirse específicamente a las secuencias del DNA, las proteínas reguladoras deben reconocer características de superficie del DNA. La mayoría de los grupos químicos que distinguen las cuatro bases y permiten la discriminación entre pares de bases son grupos dadores o aceptores de enlaces de hidrógeno que se hallan expuestos en el surco mayor del DNA **(Fig. 28–8)**, y la mayoría de contactos proteína-DNA que confieren especificidad son enlaces de hidrógeno. Una excepción es la superficie no polar cerca del C-5 de las pirimidinas, donde la timina se distingue bien de la citosina por su grupo metilo protuberante. Los contactos proteína-DNA también son posibles en el surco menor del DNA, pero en este caso los patrones de enlaces de hidrógeno no permiten una fácil discriminación entre pares de bases.

Dentro de las proteínas reguladoras, las cadenas laterales de los aminoácidos que más a menudo forman enlaces de hidrógeno con las bases del DNA son las de los residuos Asn, Gln, Glu, Lys y Arg. ¿Existe un código de reconocimiento simple en el que un aminoácido particular siempre se aparee con una base particular? Los dos enlaces de hidrógeno que se pueden formar entre Gln o Asn y las posiciones N^6 y N-7 de la adenina no se pueden formar con ninguna otra base, mientras que un residuo Arg puede formar dos enlaces de hidrógeno con el N-7 y el O^6 de la guanina **(Fig. 28–9)**. El examen de las estructuras de

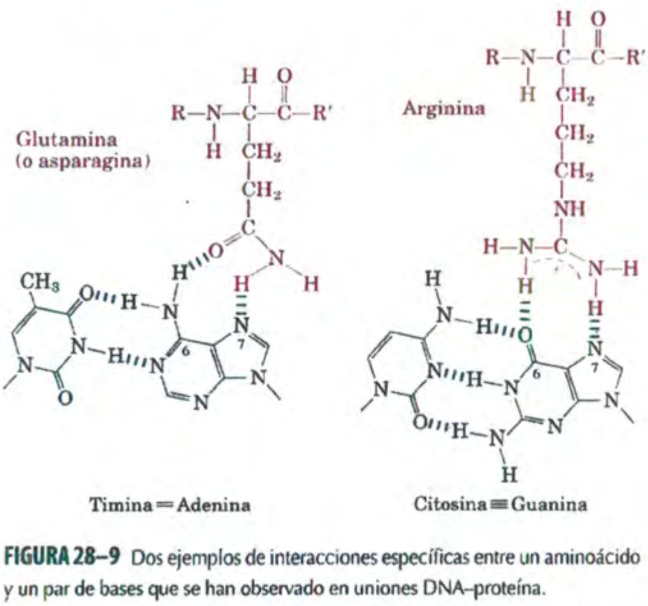


FIGURA 28–9 Dos ejemplos de interacciones específicas entre un aminoácido y un par de bases que se han observado en uniones DNA–proteína.

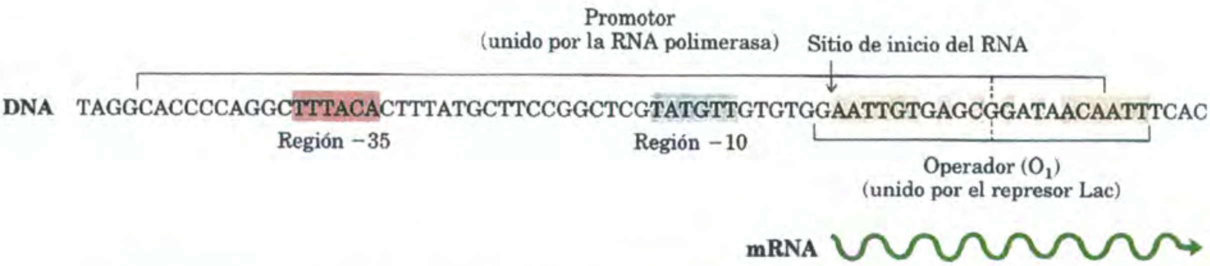


FIGURA 28–10 Relación entre la secuencia O_1 del operador *lac* y el promotor *lac*. Las bases coloreadas en beige muestran simetría binaria (palindrómica) alrededor del eje indicado por la línea de trazos vertical.

muchas proteínas de unión al DNA ha mostrado, no obstante, que una proteína puede reconocer cada par de bases de más de una manera, lo cual ha llevado a la conclusión de que no existe un código de reconocimiento simple de un aminoácido por una base. En algunas proteínas, la interacción Gln-adenina puede especificar el par de bases A═T, pero en otras el reconocimiento de los pares de bases A═T depende de una cavidad de van der Waals para el grupo metilo de la timina. Todavía no es posible examinar la estructura de una proteína de unión al DNA y deducir la secuencia de DNA a la que se une.

Para interaccionar con las bases en el surco mayor del DNA, una proteína requiere una subestructura relativamente pequeña que sobresalga de forma estable de la superficie de la proteína. Los dominios de unión al DNA de las proteínas reguladoras tienden a ser pequeños (de 60 a 90 residuos aminoácidos) y los motivos estructurales dentro de estos dominios que están efectivamente en contacto con el DNA son todavía más pequeños. Muchas proteínas pequeñas son inestables debido a su limitada capacidad para formar estructuras estratificadas que oculten los grupos hidrofóbicos (p. 114). Los motivos de unión al DNA forman una estructura estable muy compacta o un segmento protuberante en la superficie de la proteína.

Los sitios de unión al DNA de las proteínas reguladoras son a menudo repeticiones invertidas de una secuencia de DNA corta (un palíndromo) a la que se unen cooperativamente múltiples subunidades (normalmente dos) de una proteína reguladora. El represor Lac es inusual, ya que funciona como un tetrámero, con dos dímeros unidos por los extremos más alejados de los sitios de unión al DNA (Fig. 28–7b). Una célula de *E. coli* contiene normalmente alrededor de 20 tetrámeros del represor Lac. Cada uno de los dímeros se une separadamente a una secuencia operadora palindrómica en contacto con 17 pb de una región de 22 pb en el operón *lac* **(Fig. 28–10)**. Cada uno de los dímeros puede unirse independientemente a una secuencia operadora, de modo que uno se une generalmente a O_1 y el otro a O_2 u O_3 (como en la Figura 28–7b). La simetría de la secuencia del operador O_1 se corresponde con el eje de simetría binario de dos subunidades del represor Lac apareados. El represor Lac tetramérico se une a sus secuencias del operador in vivo con una constante de disociación calculada de 10^{-10} M. El represor discrimina entre los operadores y otras secuencias en un factor de alrededor de 10^6; por tanto, la unión a estos pocos pares de bases entre los aproximadamente 4,6 millones del cromosoma de *E. coli* es altamente específica.

Se han descrito varios motivos de unión al DNA, pero aquí nos centraremos en dos que juegan un papel principal en la unión al DNA de las proteínas reguladoras: la **hélice-giro-hélice** y el **dedo de zinc.** También consideraremos un tipo de dominio de unión al DNA —el homeodominio— que se ha encontrado en algunas proteínas eucarióticas.

Hélice-giro-hélice Este motivo de unión al DNA es crucial para la interacción de muchas proteínas reguladoras bacterianas con el DNA; también se han hallado motivos similares en algunas proteínas reguladoras eucarióticas. El motivo hélice-giro-hélice consta de alrededor de 20 aminoácidos en dos cortos segmentos α-helicoidales, cada uno con siete a nueve residuos aminoácidos de longitud, separados por un giro β **(Fig. 28–11)**. Esta estructura generalmente no es estable por sí sola; es simplemente la porción reactiva de un dominio de unión al DNA algo mayor. Uno de los dos segmentos α-helicoidales se denomina hélice de reconocimiento porque habitualmente contiene muchos de los aminoácidos que interaccionan con el DNA con especificidad de secuencia. Esta hélice α está apilada sobre otros segmentos de la estructura proteica, de tal manera que sobresale de la superficie de la proteína. Cuando está unida al DNA, la hélice de reconocimiento se sitúa en el interior o casi en el interior del surco mayor. El represor Lac tiene este motivo de unión al DNA (Fig. 28–11).

Dedo de zinc En un dedo de zinc, unos 30 residuos aminoácidos forman un lazo alargado sujeto por su base por un único ión Zn^{2+}, coordinado con cuatro de los residuos (cuatro Cys o dos Cys y dos His). El zinc no interacciona directamente con el DNA; más bien, la coordinación del zinc con los residuos aminoácidos estabiliza este pequeño motivo estructural. Varias cadenas laterales hidrofóbicas en el núcleo de la estructura también contribuyen a la estabilidad. La **Figura 28–12** muestra la interacción entre el DNA y tres dedos de zinc de un único polipéptido de la proteína reguladora Zif 268 del ratón.

Muchas proteínas de unión al DNA eucarióticas poseen dedos de zinc. La interacción de un único dedo de zinc con el DNA es débil, y muchas proteínas que se unen al DNA, tales como Zif268, tienen múltiples dedos de zinc que potencian notablemente la unión interaccionando simultáneamente con el DNA. Una proteína de unión al DNA de la rana *Xenopus* tiene 37 dedos de zinc. Existen pocos ejemplos conocidos de motivos con dedos de zinc en las proteínas bacterianas.

El modo preciso de unión de las proteínas con dedos de zinc al DNA varía según la proteína. Algunos dedos de zinc contienen residuos aminoácidos que son importantes en la discriminación de secuencias, mientras que en otros parece que se unen

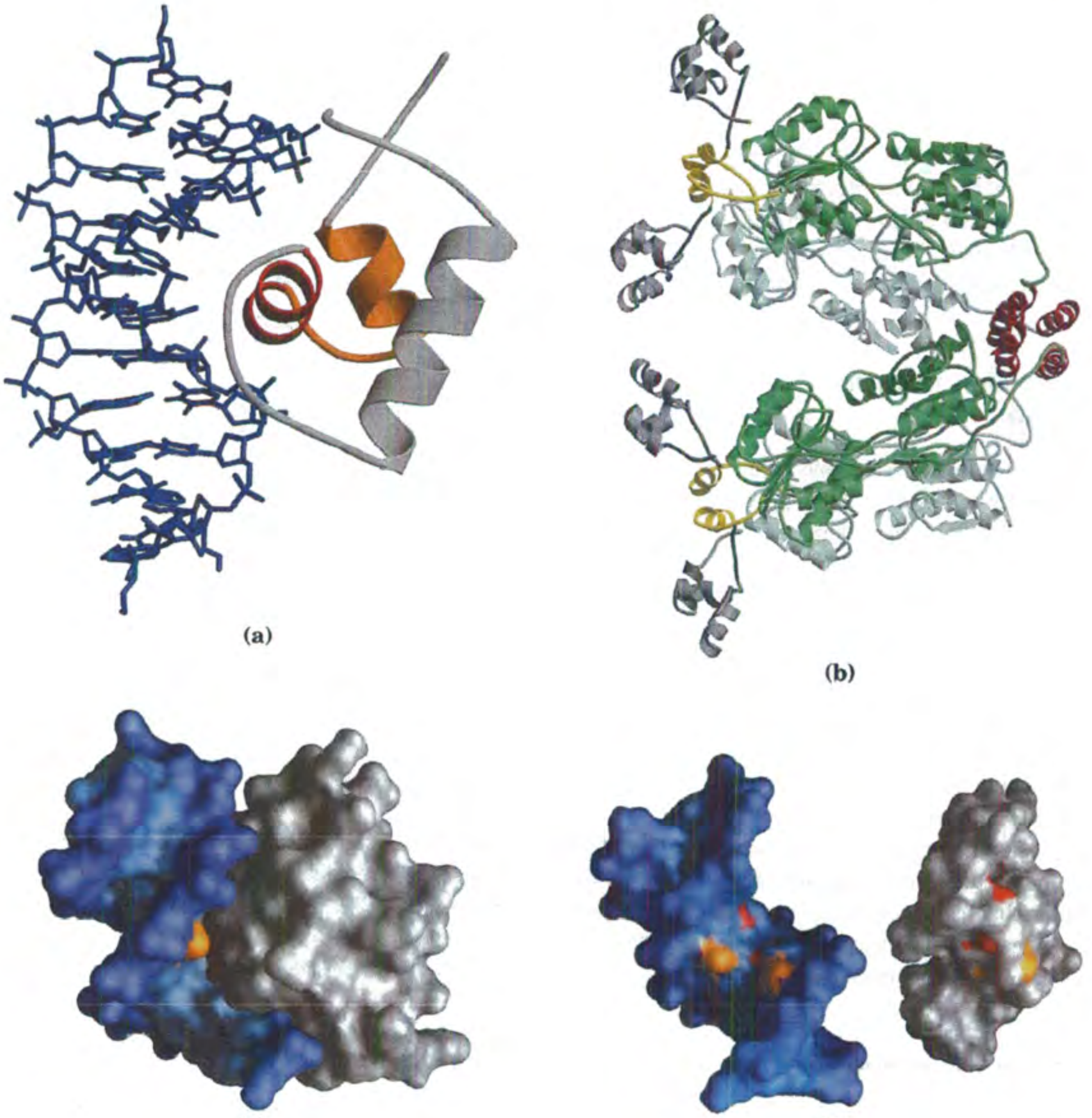


FIGURA 28–11 Hélice-giro-hélice. (a) Dominio de unión al DNA del represor Lac (PDB ID 1LCC). El motivo hélice-giro-hélice se muestra en rojo y naranja. La hélice de reconocimiento del DNA está en rojo. **(b)** Represor Lac completo (PDB ID 1LBG) con los dominios de unión al DNA en gris y las hélices α implicadas en la tetramerización en rojo. El resto de la proteína (tonos de verde) tiene los sitios de unión para la alolactosa. Los dominios de unión a la alolactosa están unidos a los dominios de unión al DNA mediante hélices de conexión (en amarillo). **(c)** Representación de la superficie del dominio de unión al DNA del represor Lac (en gris) unido al DNA (en azul). **(d)** El mismo dominio de unión al DNA que en **(c)**, pero separado del DNA, mostrando las superficies de interacción. Algunos grupos de la proteína y del DNA que interaccionan mediante enlaces de hidrógeno se muestran en rojo; algunos grupos que interaccionan mediante interacciones hidrofóbicas se representan en naranja. Solamente se muestran algunos de los grupos implicados en el reconocimiento de la secuencia. La naturaleza complementaria de las dos superficies es evidente.

al DNA de forma no específica (los aminoácidos requeridos para la especificidad se encuentran en otro lugar de la proteína). Los dedos de zinc también pueden funcionar como motivos de unión al RNA, como en ciertas proteínas que se unen a mRNA eucarióticos y que actúan como represores de la traducción. Este papel se discutirá más adelante (Sección 28.3).

Homeodominio Se ha identificado otro dominio de unión al DNA en algunas proteínas que actúan como reguladores de la

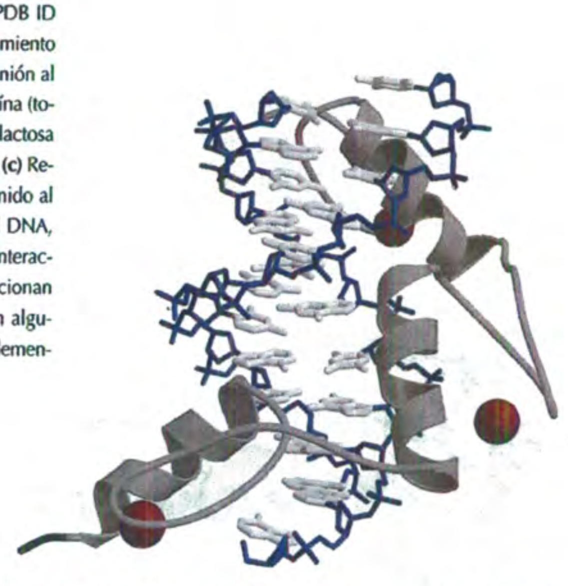


FIGURA 28–12 Dedos de zinc. Tres dedos de zinc (en gris) de la proteína reguladora Zif268, formando un complejo con el DNA (en azul y en blanco) (PDB ID 1A1L). Cada Zn^{2+} (en granate) está coordinado con dos residuos His y dos Cys (no mostrados).

transcripción, especialmente durante el desarrollo eucariótico. Este dominio de 60 aminoácidos —denominado **homeodominio,** ya que fue descubierto en los genes homeóticos (genes que regulan el desarrollo de los patrones corporales)— está altamente conservado y se ha identificado actualmente en proteínas de una amplia variedad de organismos, incluidos los humanos **(Fig. 28–13)**. El segmento de unión al DNA del dominio está relacionado con el motivo hélice-giro-hélice. La secuencia de DNA que codifica este dominio se denomina **homeosecuencia.**

Las proteínas reguladoras también tienen dominios de interacción proteína-proteína

Las proteínas reguladoras contienen dominios no sólo para la unión al DNA sino también para interacciones proteína-proteína: con la RNA polimerasa, otras proteínas reguladoras u otras subunidades de la misma proteína reguladora. Entre ellas, se cuentan muchos factores de transcripción eucarióticos que funcionan como activadores génicos, que a menudo se unen al DNA como dímeros, utilizando dominios de unión al DNA que contienen dedos de zinc. Algunos dominios estructurales están implicados en las interacciones necesarias para la formación de dímeros, que generalmente es un requisito previo para la unión al DNA. Como en los motivos de unión al DNA, los motivos estructurales que intervienen en las interacciones proteína-proteína habitualmente forman parte de alguna de unas pocas categorías. Dos ejemplos importantes son la **cremallera de leucina** y la **hélice-lazo-hélice básica.** Los motivos estructurales de este tipo son el fundamento de la clasificación de algunas proteínas reguladoras en familias estructurales.

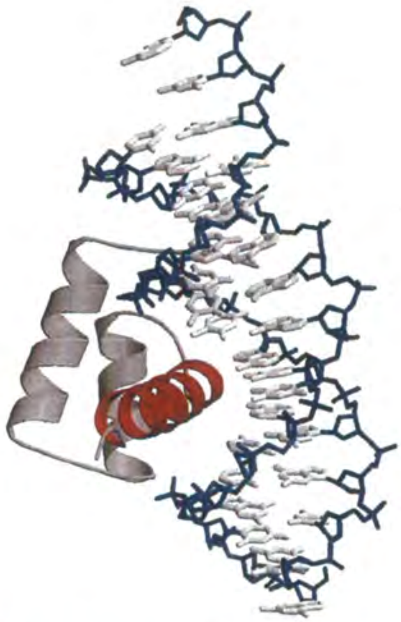
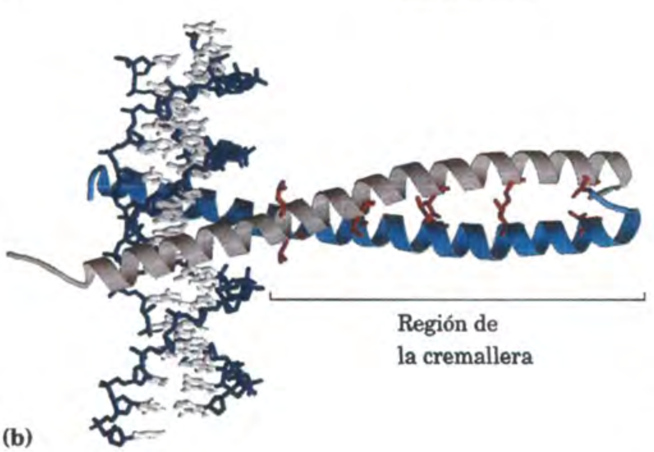


FIGURA 28–13 Homeodominio. Aquí se muestra un homeodominio unido al DNA. Se puede ver una de las hélices α (en rojo), apilada sobre otras dos, dentro del surco mayor (PDB ID 1B8I). Ésta es solamente una pequeña parte de la proteína Ultrabitórax (Ubx) mucho más grande, implicada en la regulación del desarrollo en la mosca del vinagre (véase la Sección 28.3).

Cremallera de leucina Este motivo consiste en una hélice α anfipática con una serie de residuos aminoácidos hidrofóbicos concentrados en un lado **(Fig. 28–14)**, con la superficie hidrofóbica formando el área de contacto entre los dos polipéptidos de un dímero. Una característica notable de estas hélices

Origen	Proteína reguladora	Secuencia de aminoácidos: Región de unión al DNA	Conector de 6 aminoácidos	Cremallera de leucina
Mamífero	C/EBP	DKNSNEYRVRRERNNIAVRKSRDKA	KQRNVE	TQQKVLELTSDNDRLRKRVEQLSRELDTLRG–
	Jun	SQERIKAERKRMRNRIAASKCRKRK	LERIAR	LEEKVKTLKAQNSELASTANMLTEQVAQLKQ–
	Fos	EERRRIRRIRRERNKMAAAKCRNRR	RELTDT	LQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEF–
Levadura	GCN4	PESSDPAALKRARNTEAARRSRARK	LQRMKQ	LEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER
	Molécula consenso	---------RR/KK-R/K-N-------R/K-R-RR/KK	------	L------L------L------L------L---

(a) Asn invariante



(b)

FIGURA 28–14 Cremalleras de leucina. (a) Comparación de las secuencias de aminoácidos de varias proteínas con cremalleras de leucina. Observe los residuos de Leu (L) que se encuentran en cada séptima posición de la región de la cremallera y el número de residuos Lys (K) y Arg (R) en la región de unión al DNA. **(b)** Cremallera de leucina de la proteína activadora GCN4 de levadura (PDB ID 1YSA). Sólo se muestran las hélices α "en cremallera" (en gris y en azul claro), procedentes de diferentes subunidades de la proteína dimérica. Las dos hélices se enrollan una en torno de la otra formando una suave hélice espiralada. Los residuos Leu que interaccionan se muestran en rojo.

α es la existencia de residuos Leu en cada séptima posición, formando una línea recta a lo largo de la superficie hidrofóbica. Aunque inicialmente se pensó que los residuos Leu estaban interdigitados (de ahí el nombre de "cremallera"), ahora sabemos que se alinean uno al lado de otro en las hélices α que interaccionan enrollándose una en torno de la otra (formando una hélice espiralada; Fig. 28–14b). Las proteínas reguladoras con cremalleras de leucina suelen tener un dominio de unión al DNA separado con una elevada concentración de residuos básicos (Lys o Arg), que pueden interaccionar con los fosfatos cargados negativamente del esqueleto del DNA. Las cremalleras de leucina se han encontrado en muchas proteínas eucarióticas y en algunas bacterianas.

Hélice-lazo-hélice básica Otro motivo estructural frecuente se da en algunas proteínas reguladoras eucarióticas implicadas en el control de la expresión génica durante el desarrollo de los organismos multicelulares. Estas proteínas comparten una región conservada de unos 50 residuos aminoácidos importantes tanto en la unión al DNA como en la dimerización de las proteínas. Esta región puede formar dos hélices α anfipáticas cortas unidas por un lazo de longitud variable, la hélice-lazo-hélice (diferente del motivo hélice-giro-hélice, implicado en la unión al DNA). Los motivos hélice-lazo-hélice de dos polipéptidos interaccionan para formar dímeros **(Fig. 28–15)**. En la unión al DNA de estas proteínas interviene una corta secuencia de aminoácidos adyacente con abundantes residuos básicos, similar a la región de unión al DNA separada de las proteínas que contienen cremalleras de leucina.

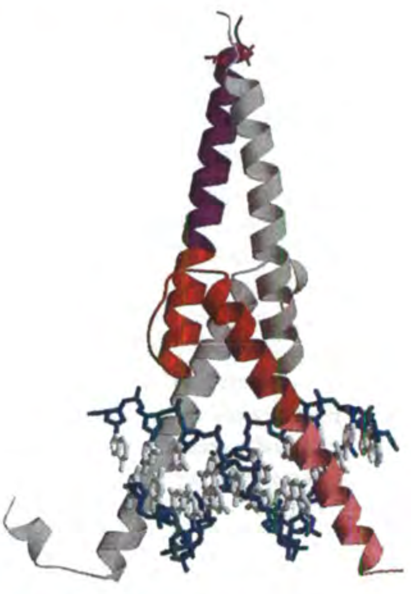


FIGURA 28–15 Hélice-lazo-hélice. Se muestra el factor de transcripción humano Max, unido a su sitio diana del DNA (PDB ID 1HLO). La proteína es dimérica; una subunidad está coloreada. El segmento de unión al DNA (en rosa) se une con la primera hélice de la hélice-lazo-hélice (en rojo). La segunda hélice se une con el extremo carboxilo-terminal de la subunidad (en púrpura). Las hélices carboxilo-terminales de las dos subunidades adoptan la conformación de hélice espiralada, muy similar a la de las cremalleras de leucina (véase la Fig. 28–14b), pero con un solo un par de residuos Leu interaccionando (las cadenas laterales en rojo están cerca de la parte superior) en este ejemplo particular. El conjunto de la estructura a veces se denomina motivo hélice-lazo-hélice/cremallera de leucina.

Mezcla de subunidades en las proteínas reguladoras eucarióticas Se han definido varias familias de factores de transcripción eucarióticos sobre la base de estrechas similitudes estructurales. Dentro de cada familia, los dímeros se pueden formar a veces entre dos proteínas idénticas (un homodímero) o entre dos miembros diferentes de la familia (un heterodímero). Una familia hipotética de cuatro proteínas diferentes con cremalleras de leucina podría formar por tanto hasta diez especies diméricas distintas. En muchos casos, las diferentes combinaciones parecen tener distintas propiedades reguladoras y funcionales.

Además de los dominios estructurales implicados en la unión al DNA y la dimerización (u oligomerización), muchas proteínas reguladoras tienen que interaccionar con la RNA polimerasa, con otras proteínas reguladoras no relacionadas, o con ambas. Se han caracterizado al menos tres tipos diferentes de dominios adicionales para la interacción proteína-proteína (principalmente en eucariotas): dominios ricos en glutamina, ricos en prolina y acídicos, cuyos nombres reflejan los residuos aminoácidos que son especialmente abundantes.

Las interacciones de unión proteína-DNA son la base de los complejos circuitos reguladores fundamentales para la función génica. A continuación examinaremos más detalladamente estos esquemas de regulación génica, primero en los sistemas bacterianos y después en los eucarióticos.

RESUMEN 28.1 Principios de regulación génica

- La expresión de los genes está regulada por procesos que influyen en la velocidad de síntesis y degradación de los productos génicos. La regulación ocurre en buena medida a nivel del inicio de la transcripción en promotores específicos, mediante la intervención de proteínas reguladoras, que pueden tanto reprimir la transcripción (regulación negativa) como activarla (regulación positiva).
- En las bacterias, los genes que codifican productos con funciones interdependientes se encuentran a menudo agrupados en un operón, que actúa como una unidad de transcripción. La transcripción de los genes se bloquea generalmente por la unión de una proteína represora específica en un sitio del DNA denominado operador. La disociación del represor del operador es provocada por una pequeña molécula específica, un inductor. Estos principios se establecieron por primera vez en los estudios del operón lactosa (*lac*). El represor Lac se disocia del operador *lac* cuando el represor se une a su inductor, la alolactosa.
- Las proteínas reguladoras son proteínas de unión al DNA que reconocen secuencias específicas del DNA; la mayoría poseen dominios de unión al DNA característicos. Entre ellos, son comunes la hélice-giro-hélice, el dedo de zinc y el homeodominio.
- Las proteínas reguladoras también contienen dominios de interacción proteína-proteína, entre los que se encuentran la cremallera de leucinas y la hélice-lazo-hélice, que están implicados en la dimerización, y otros motivos responsables de la activación de la transcripción.

28.2 Regulación de la expresión génica en bacterias

Como en muchas otras áreas de la investigación bioquímica, el estudio de la regulación de la expresión génica en las bacterias avanzó antes y con mayor rapidez que en otros organismos de experimentación. Los ejemplos de regulación génica bacteriana que aquí se presentan se han escogido entre una serie de sistemas bien estudiados, en parte por su importancia histórica, pero principalmente porque dan una buena visión de la variedad de mecanismos reguladores utilizados por las bacterias. Muchos de los principios de la regulación génica bacteriana son también aplicables al conocimiento de la expresión génica en células eucarióticas.

Empezaremos examinando los operones de la lactosa y el triptófano; ambos sistemas tienen proteínas reguladoras, pero los mecanismos generales de regulación son muy diferentes. Seguiremos con una breve discusión de la respuesta SOS en *E. coli*, que ilustra de qué modo los genes dispersos por todo el genoma pueden estar regulados de forma coordinada. Posteriormente describiremos dos sistemas bacterianos muy distintos, que ilustran la diversidad de mecanismos de regulación génica: la regulación de la síntesis de proteínas ribosómicas a nivel de traducción, en la que muchas de las proteínas reguladoras se unen al RNA (en lugar del DNA), y la regulación de un proceso denominado "variación de fase" en *Salmonella*, que es consecuencia de la recombinación genética. Finalmente, examinaremos algunos ejemplos adicionales de regulación postranscripción en los que el RNA modula su propia función.

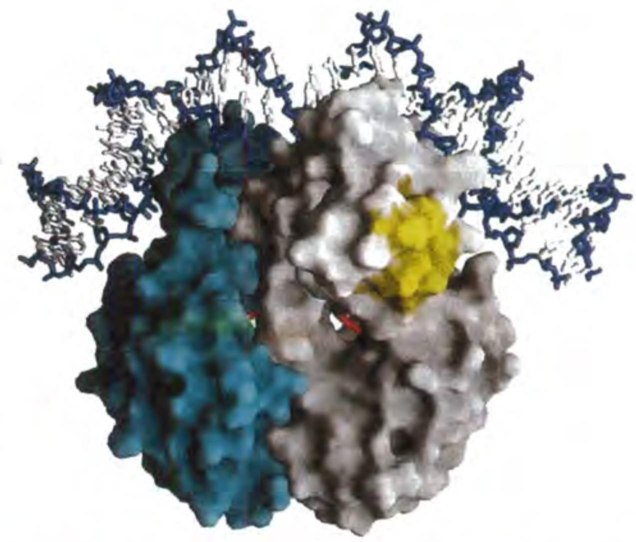


FIGURA 28–16 Homodímero CRP. (PDB ID 1RUN) Las moléculas de cAMP unidas se muestran en rojo. Obsérvese la curvatura del DNA alrededor de la proteína. La región que interacciona con la RNA polimerasa está coloreada de amarillo.

El operón *lac* está sujeto a regulación positiva

Las interacciones operador-represor-inductor descritas anteriormente para el operón *lac* (Fig. 28–7) ofrecen un modelo intuitivo satisfactorio de la conexión/desconexión en la regulación de la expresión génica. En realidad, la regulación del operón raramente es tan simple. El ambiente de una bacteria es demasiado complejo para que sus genes sean controlados por una sola señal. Otros factores, además de la lactosa, afectan la expresión de los genes *lac*, como por ejemplo la disponibilidad de glucosa. La glucosa, metabolizada directamente por la glucólisis, es la fuente de energía preferida por *E. coli*. Otros azúcares pueden servir como principal o único nutriente, pero se necesitan etapas adicionales para preparar su entrada en la glucólisis, que requieren la síntesis de enzimas adicionales. Está claro que la expresión de genes de proteínas que metabolicen azúcares tales como la lactosa o la arabinosa es un derroche si la glucosa es abundante.

¿Qué sucede con la expresión del operón *lac* cuando tanto la glucosa como la lactosa están presentes? Otro mecanismo de regulación, denominado **represión por catabolito,** impide la expresión de los genes para el catabolismo de la lactosa, la arabinosa y otros azúcares en presencia de glucosa, incluso cuando estos azúcares secundarios también están presentes. El efecto de la glucosa está facilitado por el cAMP, como coactivador, y una proteína activadora denominada **proteína receptora de cAMP,** o **CRP** (la proteína se denomina a veces CAP, por *pro*teína *a*ctivadora del gen del *c*atabolito). El CRP es un homodímero (M_r de la subunidad 22.000) con sitios de unión para el DNA y el cAMP. La unión está facilitada por un motivo hélice-giro-hélice del dominio de unión al DNA de la proteína **(Fig. 28–16)**. En ausencia de glucosa, la CRP-cAMP se une a un sitio cerca del promotor *lac* **(Fig. 28–17a)** y estimula 50 veces la transcripción del RNA. La CRP-cAMP es, por tanto, un elemento de regulación positiva sensible a los niveles de glucosa, mientras que el represor Lac es un elemento de regulación negativa sensible a la lactosa. Los dos actúan conjuntamente. La CRP-cAMP tiene poco efecto sobre el operón *lac* cuando el represor Lac está bloqueando la transcripción y la disociación del represor del operador *lac* tiene poco efecto en la transcripción del operón *lac* a menos que la CRP-cAMP esté presente para facilitar la transcripción; cuando la CRP no está unida, el promotor *lac* salvaje es un promotor relativamente débil (Fig. 28–17b). El complejo abierto de la RNA polimerasa y el promotor (véase la Fig. 26–6) no se forma fácilmente a menos que la CRP-cAMP esté presente. La CRP interacciona directamente con la RNA polimerasa (en la región mostrada en la Fig. 28–16) a través de la subunidad α.

El efecto de la glucosa sobre la CRP está facilitado por la interacción del cAMP **(Fig. 28–18)**. La CRP se une al DNA con mayor afinidad cuando las concentraciones de cAMP son altas. En presencia de glucosa, la síntesis de cAMP está inhibida y se estimula la salida de cAMP de la célula. A medida que la [cAMP] desciende, la unión de la CRP al DNA disminuye y en consecuencia también disminuye la expresión del operón *lac*. Una fuerte inducción del operón *lac* requiere tanto lactosa (para inactivar el represor *lac*) como una baja concentración de glucosa (para provocar un aumento de la [cAMP], así como de la unión del cAMP a la CRP).

La CRP y el cAMP están implicados en la regulación coordinada de muchos operones, principalmente los que codifican enzimas para el metabolismo de azúcares secundarios tales como la lactosa y la arabinosa. Una red de operones con un regulador

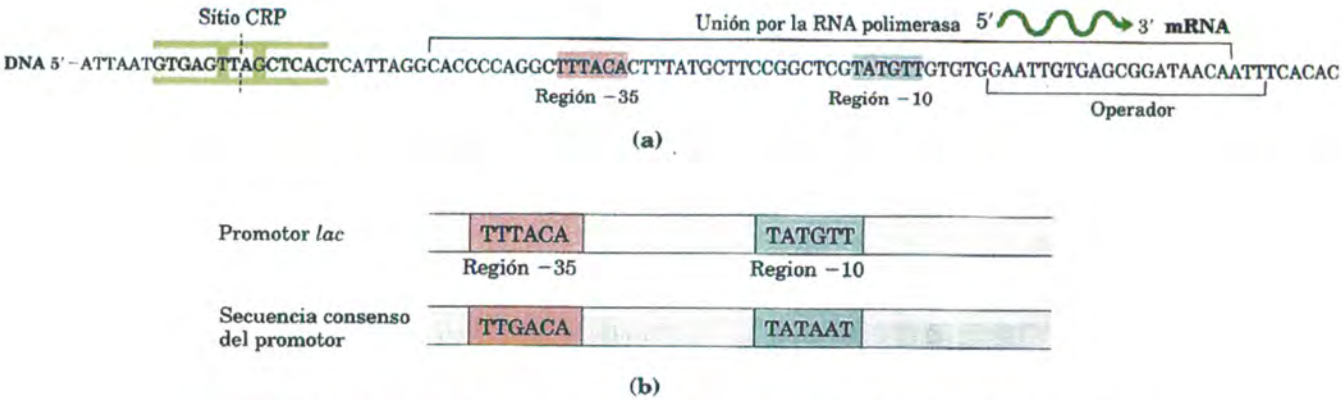


FIGURA 28–17 **Activación de la transcripción del operón *lac* por la CRP.** **(a)** El sitio de unión para la CRP–cAMP está próximo al promotor. Como en el caso del operador *lac*, el sitio de la CRP tiene simetría binaria (las bases están coloreadas en beige) alrededor del eje indicado por la línea discontinua. **(b)** Secuencia del promotor *lac* comparado con la secuencia consenso del promotor. Las diferencias indican que la RNA polimerasa se une de forma relativamente débil al promotor *lac* hasta que la polimerasa se activa por la CRP–cAMP.

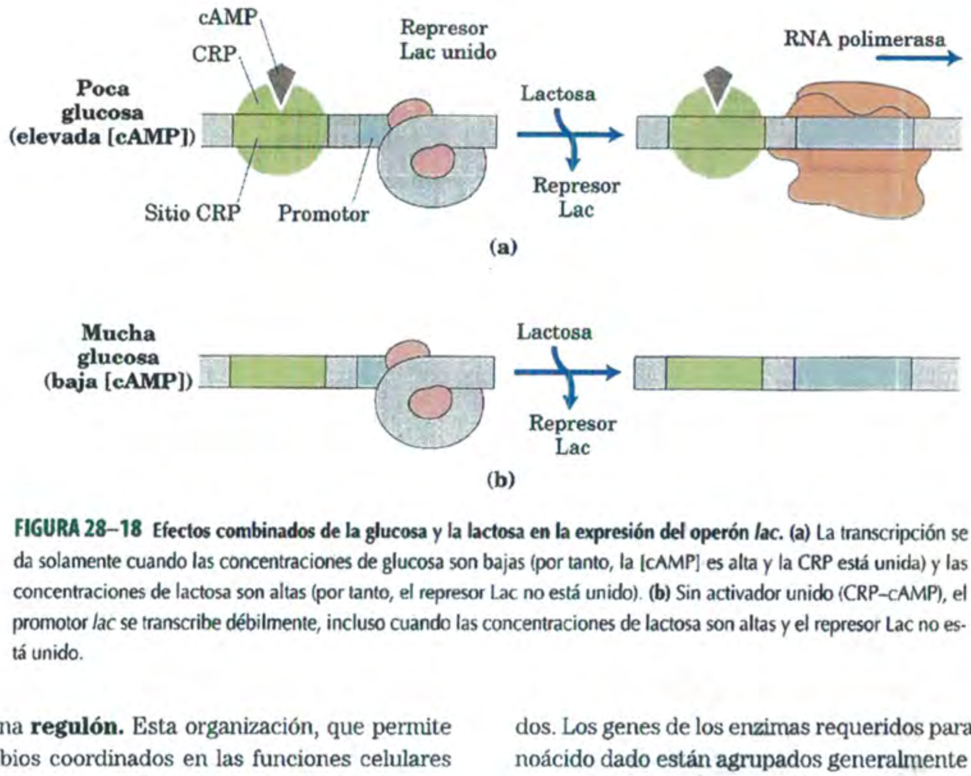


FIGURA 28–18 **Efectos combinados de la glucosa y la lactosa en la expresión del operón *lac*.** **(a)** La transcripción se da solamente cuando las concentraciones de glucosa son bajas (por tanto, la [cAMP] es alta y la CRP está unida) y las concentraciones de lactosa son altas (por tanto, el represor Lac no está unido). **(b)** Sin activador unido (CRP–cAMP), el promotor *lac* se transcribe débilmente, incluso cuando las concentraciones de lactosa son altas y el represor Lac no está unido.

común se denomina **regulón.** Esta organización, que permite llevar a cabo cambios coordinados en las funciones celulares que pueden implicar centenares de genes, es un tema de gran importancia en la expresión regulada de redes dispersas de genes en eucariotas. Otros regulones bacterianos son el sistema del gen del choque térmico que responde a cambios de temperatura (pág. 1028) y los genes inducidos en *E. coli* como parte de la respuesta SOS frente a las lesiones del DNA, descritos más adelante.

Muchos genes de los enzimas de la biosíntesis de aminoácidos se regulan por atenuación de la transcripción

Los 20 aminoácidos comunes se requieren en grandes cantidades para la síntesis de proteínas y *E. coli* puede sintetizarlos todos. Los genes de los enzimas requeridos para sintetizar un aminoácido dado están agrupados generalmente en un operón y se expresan siempre que la disponibilidad de ese aminoácido sea inadecuada para cubrir las necesidades celulares. Cuando el aminoácido es abundante, los enzimas biosintéticos no son necesarios y el operón se reprime.

El operón del triptófano (*trp*) de *E. coli* **(Fig. 28–19)** contiene los cinco genes de los enzimas requeridos para convertir el corismato en triptófano. Observe que dos de los enzimas catalizan más de un paso en la vía. El mRNA del operón *trp* tiene una vida media de sólo unos 3 min, lo que permite que la célula responda rápidamente a las necesidades cambiantes de este aminoácido. El represor Trp es un homodímero, cuyas subunidades contienen 107 residuos aminoácidos **(Fig. 28–20)**. Cuando el triptófano es abundante, se une al represor Trp, provocando un

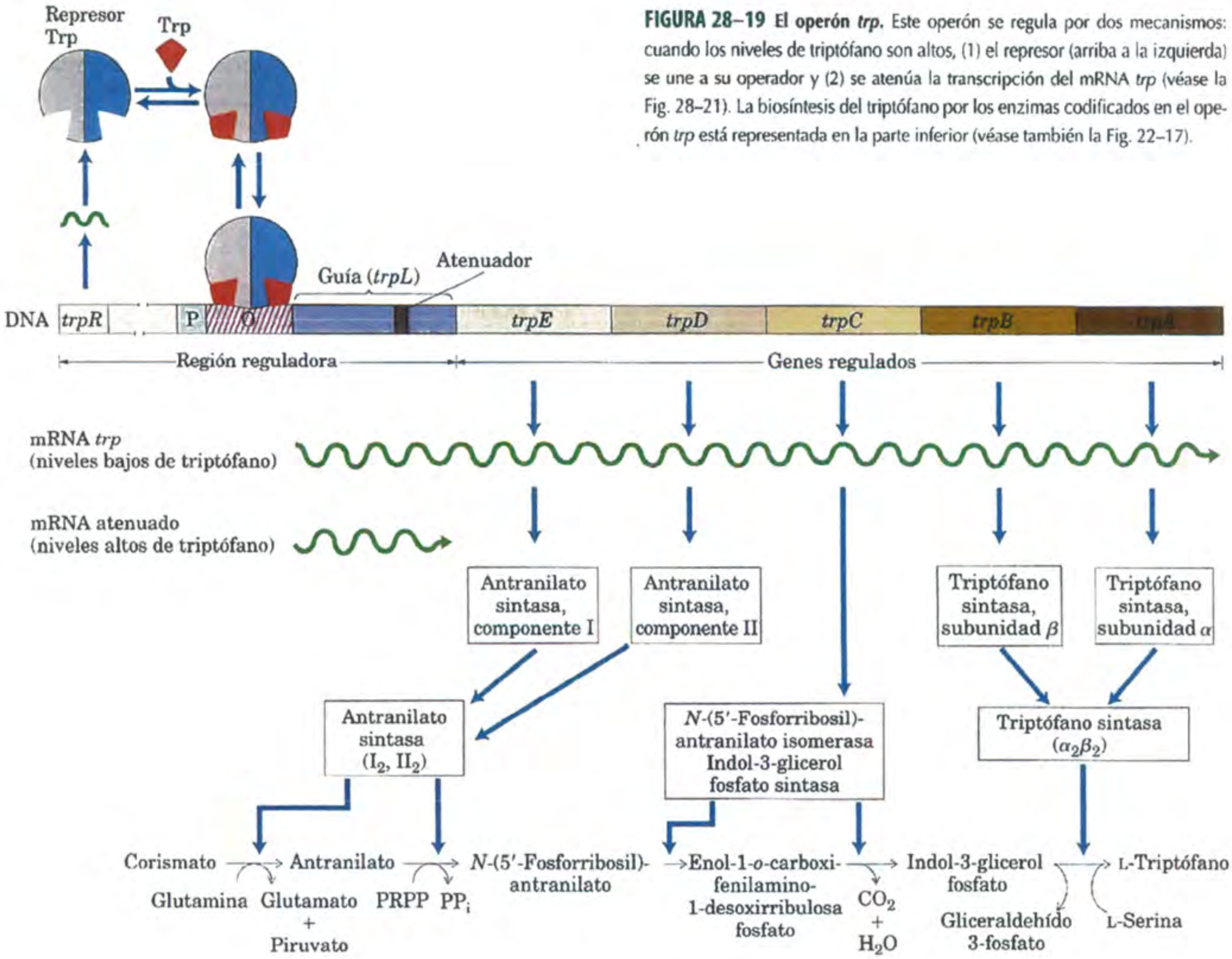


FIGURA 28–19 El operón *trp*. Este operón se regula por dos mecanismos: cuando los niveles de triptófano son altos, (1) el represor (arriba a la izquierda) se une a su operador y (2) se atenúa la transcripción del mRNA *trp* (véase la Fig. 28–21). La biosíntesis del triptófano por los enzimas codificados en el operón *trp* está representada en la parte inferior (véase también la Fig. 22–17).

cambio de conformación que permite al represor unirse al operador *trp* e inhibir la expresión del operón *trp*. El sitio del operador *trp* se solapa con el promotor, por lo que la unión del represor puede bloquear la unión de la RNA polimerasa.

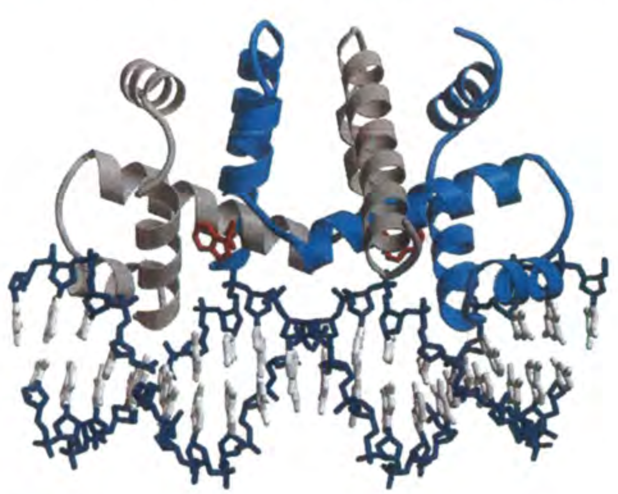


FIGURA 28–20 Represor Trp. El represor es un dímero; ambas subunidades (en gris y en azul claro) se unen al DNA con motivos hélice-giro-hélice (PDB ID 1TRO). Las moléculas de triptófano unidas están en rojo.

De nuevo, este simple circuito de conexión/desconexión facilitado por un represor no constituye la totalidad del sistema de regulación. Diferentes concentraciones celulares de triptófano pueden variar la velocidad de síntesis de los enzimas biosintéticos en un intervalo de unas 700 veces. Acabada la represión y restablecida la transcripción, la velocidad de transcripción se ajusta mediante un segundo proceso de regulación denominado **atenuación de la transcripción,** en el que la transcripción se inicia normalmente pero se interrumpe bruscamente *antes* de que los genes del operón se transcriban. La frecuencia de atenuación de la transcripción está regulada por la disponibilidad de triptófano y depende del rígido acoplamiento de la transcripción y la traducción en las bacterias.

El mecanismo de atenuación del operón *trp* utiliza señales codificadas en cuatro secuencias dentro de una región **guía** de 162 nucleótidos en el extremo 5′ del mRNA que precede al codón de inicio del primer gen **(Fig. 28–21a)**. Dentro de la secuencia guía se encuentra una región denominada **atenuador,** constituida por las secuencias 3 y 4. Estas secuencias se aparean para formar una estructura en horquilla rica en G≡C, seguida inmediatamente por una serie de residuos U. La estructura del atenuador actúa como terminador de la transcripción (Fig. 28–21b). La secuencia 2 es un complemento al-

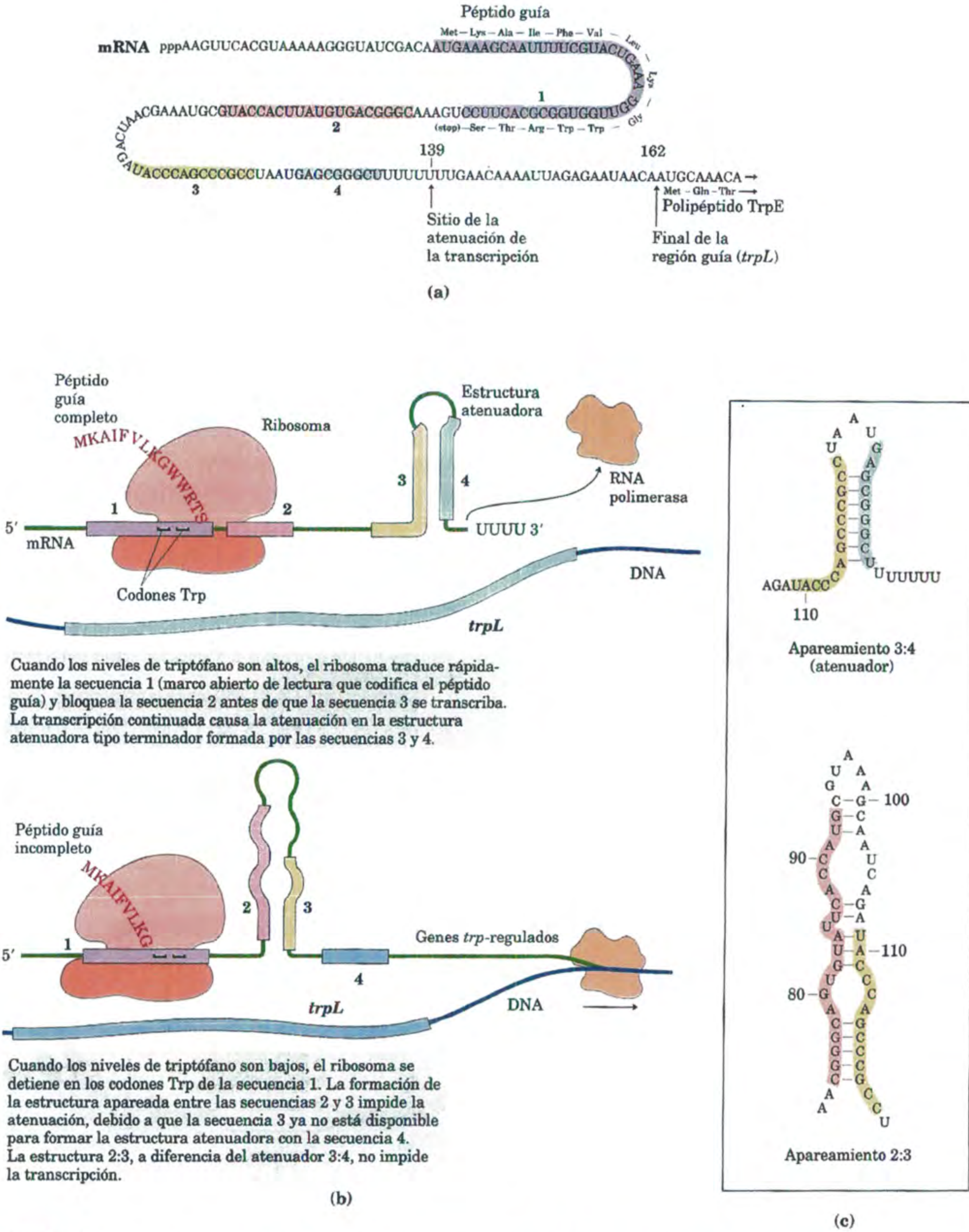


FIGURA 28–21 Atenuación de la transcripción en el operón *trp*. La transcripción se inicia al principio de la guía de 162 nucleótidos del mRNA codificada por una región del DNA denominada *trpL* (véase la Fig. 28–19). Un mecanismo regulador determina si la transcripción se atenúa al final de la guía o continúa hacia los genes estructurales. **(a)** El mRNA *trp* guía (*trpL*). El mecanismo de atenuación en el operón *trp* implica a las secuencias 1 a 4 (resaltadas). **(b)** La secuencia 1 codifica un péptido pequeño, el péptido guía, que contiene dos residuos Trp (W); se traduce inmediatamente después de que empiece la transcripción. Las secuencias 2 y 3 son complementarias, al igual que las secuencias 3 y 4. La estructura atenuadora se forma mediante el apareamiento de las secuencias 3 y 4 (arriba). Su estructura y función son similares a las de un terminador de la transcripción (véase la Fig. 26–8). El apareamiento de las secuencias 2 y 3 (abajo) impide que se forme la estructura atenuadora. Obsérvese que el péptido guía no tiene ninguna otra función celular. La traducción de su marco abierto de lectura tiene una función puramente reguladora que determina qué secuencias complementarias (2 y 3 o 3 y 4) se aparearán. **(c)** Esquemas de apareamiento de bases para las regiones complementarias del mRNA *trp* guía.

ternativo para la secuencia 3 (Fig. 28–21c). Si se aparean las secuencias 2 y 3, la estructura atenuadora no se puede formar y la transcripción continúa en los genes biosintéticos *trp*; el lazo formado por el apareamiento de las secuencias 2 y 3 no obstaculiza la transcripción.

La secuencia reguladora 1 es crucial para el mecanismo sensible al triptófano que determina si la secuencia 3 se complementa con la secuencia 2 (permitiendo que continúe la transcripción) o con la secuencia 4 (atenuando la transcripción). La formación de la estructura atenuadora en horquilla depende de cómo transcurra la *traducción* de la secuencia 1 reguladora, que codifica un péptido guía (denominado así porque está codificado por la región guía del mRNA) de 14 aminoácidos, dos de los cuales son residuos Trp. El péptido guía no tiene ninguna otra función celular conocida; su síntesis es simplemente un mecanismo de regulación del operón. Este péptido se traduce inmediatamente después de su transcripción por un ribosoma que sigue de cerca a la RNA polimerasa a medida que avanza la transcripción.

Cuando las concentraciones de triptófano son elevadas, las concentraciones de tRNA cargados con triptófano (Trp–$tRNA^{Trp}$) también son elevadas. Esto permite que la traducción proceda rápidamente, pasando por los dos codones Trp de la secuencia 1 hacia la secuencia 2 antes de que la secuencia 3 sea sintetizada por la RNA polimerasa. En esta situación la secuencia 2 quede cubierta por el ribosoma, lo que la inhabilita para aparearse con la secuencia 3 cuando ésta es sintetizada; se forma la estructura atenuadora (secuencias 3 y 4) y se interrumpe la transcripción (Fig. 28–21b, arriba). En cambio, cuando las concentraciones de triptófano son bajas, el ribosoma se atasca en los dos codones Trp de la secuencia 1 porque hay menos $tRNA^{Trp}$ cargado. La secuencia 2 permanece libre mientras se sintetiza la secuencia 3, permitiendo que estas dos secuencias se apareen y que se produzca la transcripción (Fig. 28–21b, abajo). De esta manera la proporción de transcritos que se atenúa desciende a medida que disminuye la concentración de triptófano.

Otros muchos operones biosintéticos de aminoácidos utilizan una estrategia de atenuación similar para adecuar los enzimas biosintéticos a las necesidades celulares. El péptido guía de 15 aminoácidos producido por el operón *phe* contiene siete residuos Phe. El péptido guía del operón *leu* tiene cuatro residuos Leu contiguos. El péptido guía para el operón *his* contiene siete residuos His contiguos. De hecho, en el operón *his* y en otros muchos la atenuación es suficientemente sensible para ser el *único* mecanismo de regulación.

La inducción de la respuesta SOS requiere la destrucción de proteínas represoras

Una lesión extensa del DNA en el cromosoma bacteriano provoca la inducción de muchos genes situados a gran distancia. Esta respuesta, denominada respuesta SOS (p. 1001), es otro buen ejemplo de regulación génica coordinada. Muchos de los genes inducidos están implicados en la reparación del DNA (véase la Tabla 25–6). Los elementos de regulación claves son la proteína RecA y el represor LexA.

El represor LexA (M_r 22.700) inhibe la transcripción de todos los genes SOS (**Fig. 28–22**) y la inducción de la respuesta SOS requiere la eliminación de LexA. No se trata de una simple disociación del DNA en respuesta a la unión de una molécula pequeña, como en la regulación del operón *lac*, descrita ante-

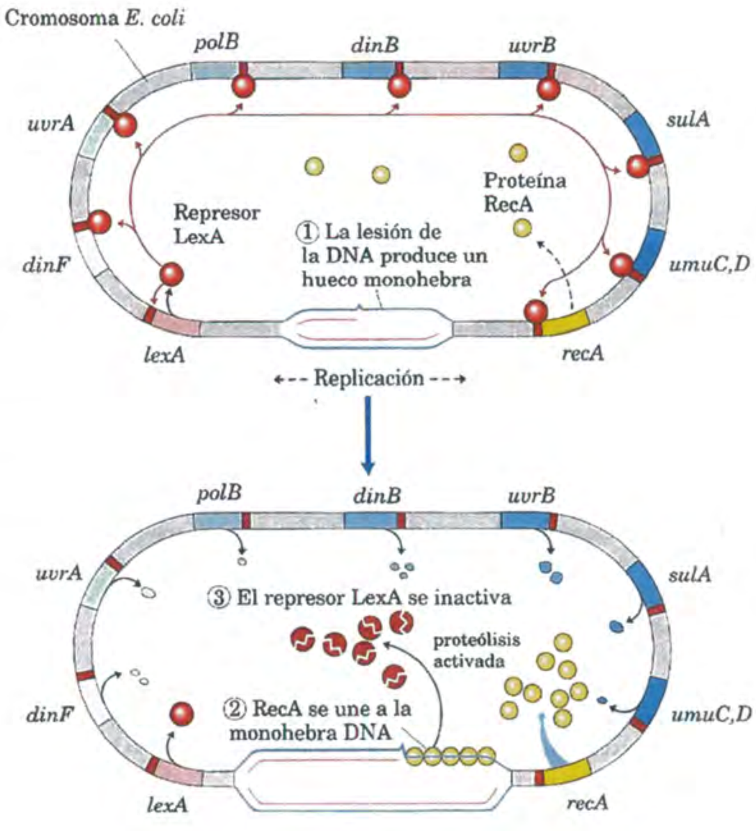


FIGURA 28–22 Respuesta SOS en *E. coli*. Véase la Tabla 25–6 para las funciones de muchas de estas proteínas. La proteína LexA es el represor en este sistema, con un sitio operador (en rojo) cerca de cada gen. La célula normal, ya que el gen *recA* no está totalmente reprimido por el represor LexA, contiene cerca de 1.000 monómeros de RecA. ① Cuando el DNA está extensamente lesionado (por ejemplo, por luz UV), la replicación del DNA se detiene y el número de huecos monohebra en el DNA aumenta. ② La proteína RecA se une a este DNA monohebra lesionado, estimulando la actividad coproteasa de la proteína. ③ Mientras está unida al DNA, la proteína RecA facilita la hidrólisis y la inactivación del represor LexA. Cuando el represor se inactiva, se inducen los genes SOS, incluido *recA*; los niveles de RecA aumentan entre 50 y 100 veces.

riormente. Al contrario, el represor LexA se inactiva cuando *cataliza su propia rotura en un enlace peptídico Ala–Gly específico*, produciendo dos fragmentos proteicos más o menos iguales. A pH fisiológico, esta reacción de autocorte requiere la proteína RecA. RecA no es una proteasa en sentido clásico, pero su interacción con LexA facilita la reacción de autocorte del represor. Esta función de RecA se denomina en ocasiones actividad coproteasa.

La proteína RecA proporciona la conexión funcional entre la señal biológica (lesión del DNA) y la inducción de los genes SOS. Una grave lesión del DNA produce numerosas zonas de DNA monohebra y solamente RecA que está unida a DNA monohebra facilita la hidrólisis del represor LexA (Fig. 28–22, abajo). La unión de RecA en esas zonas estimula su actividad coproteasa, que provoca la rotura del represor LexA y la inducción de la respuesta SOS.

Durante la inducción de la respuesta SOS en una célula gravemente dañada, RecA también corta y, por tanto, inactiva los represores que permiten la propagación de ciertos virus en un estado lisogénico latente dentro del huésped bacteriano. Éste es un ejemplo notable de adaptación evolutiva. Estos represores, como LexA, también sufren autocorte en un enlace peptídico específico Ala–Gly; por tanto, la inducción de la respuesta SOS permite la replicación del virus y la lisis de la célula, con la consiguiente liberación de nuevas partículas víricas. Así pues, el bacteriófago puede efectuar una salida apresurada de una célula huésped bacteriana en peligro.

La síntesis de proteínas ribosómicas está coordinada con la síntesis de rRNA

En las bacterias, un incremento en la demanda celular de síntesis proteica se satisface mediante el incremento del número de ribosomas en lugar de alterar la actividad de los ribosomas individuales. En general, el número de ribosomas aumenta a medida que aumenta la tasa de crecimiento celular. A tasas altas de crecimiento, los ribosomas constituyen aproximadamente el 45% del peso seco celular. La proporción de recursos celulares dedicados a la producción de ribosomas es tan grande y la función de los ribosomas tan importante que las células tienen que coordinar la síntesis de los componentes ribosómicos: proteínas ribosómicas (proteínas r) y RNA (rRNA). Esta regulación es diferente de los mecanismos descritos hasta ahora porque tiene lugar principalmente a nivel de *traducción*.

Los 52 genes que codifican las proteínas r se encuentran en 20 operones como mínimo, de entre 1 y 11 genes cada uno. Algunos de estos operones también contienen los genes para las subunidades de la DNA primasa (véase la Fig. 25–13), la RNA polimerasa (véase la Fig. 26–4) y los factores de elongación de la síntesis proteica (véase la Fig. 27–28), lo que explica el estrecho acoplamiento de la replicación, la transcripción y la síntesis proteica durante el crecimiento celular.

Los operones de proteínas r se regulan principalmente mediante un mecanismo de retroalimentación traduccional. Una proteína r codificada por un operón también actúa de **represor de la traducción**, uniéndose al mRNA transcrito de su propio operón y bloqueando así la traducción de todos los genes codificados por el mensajero **(Fig. 28–23)**. En general, la proteína r que desempeña el papel de represor también se une directamente a un rRNA. Cada proteína r represora de la traducción se une con mayor afinidad al rRNA apropiado que a su mRNA, por lo que se une al mRNA y la traducción se reprime sólo si el nivel de la proteína r excede al de rRNA. Ello asegura que la traducción

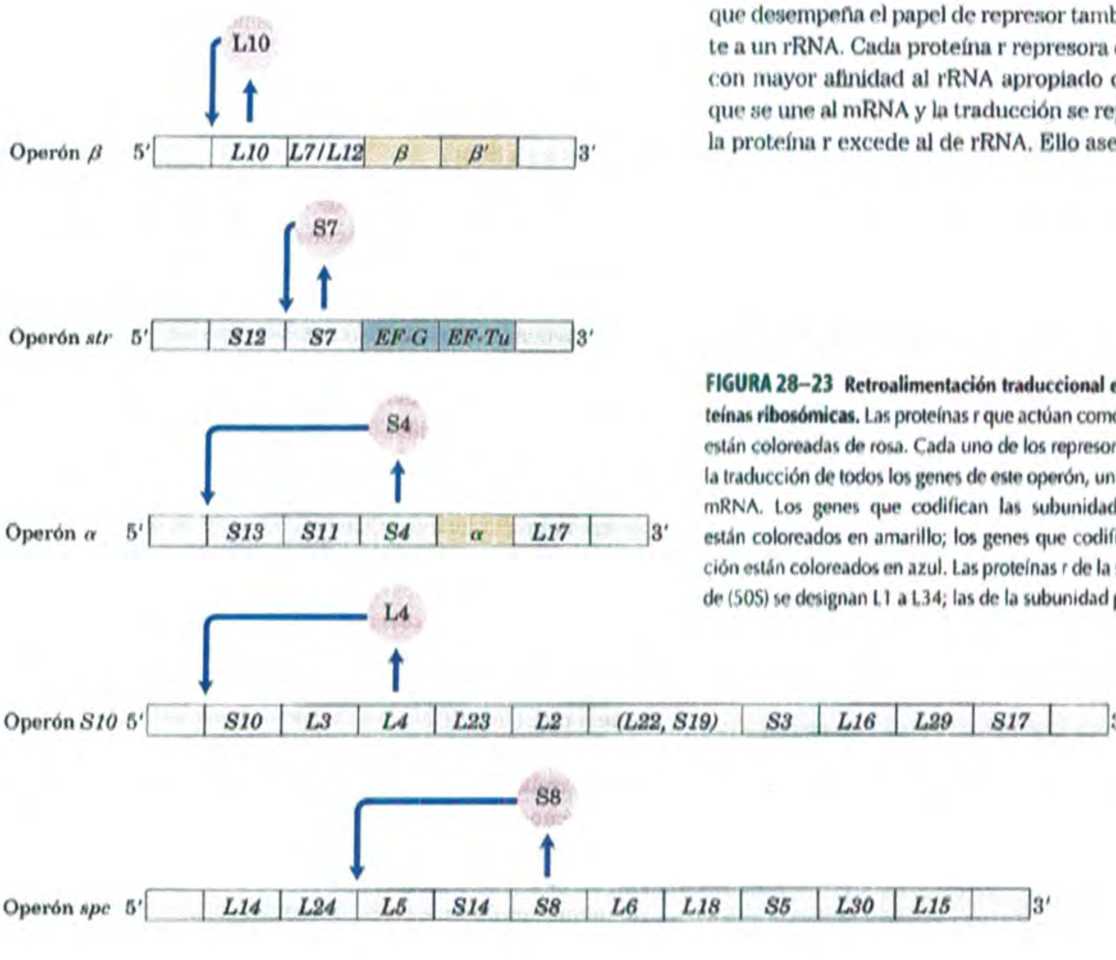


FIGURA 28–23 Retroalimentación traduccional en algunos operones de proteínas ribosómicas. Las proteínas r que actúan como represores de la traducción están coloreadas de rosa. Cada uno de los represores de la traducción bloquea la traducción de todos los genes de este operón, uniéndose al sitio indicado del mRNA. Los genes que codifican las subunidades de la RNA polimerasa están coloreados en amarillo; los genes que codifican los factores de elongación están coloreados en azul. Las proteínas *r* de la subunidad ribosómica grande (50S) se designan L1 a L34; las de la subunidad pequeña (30S), S1 a S21.

de los mRNA que codifican proteínas r se reprima sólo cuando el nivel de proteínas r exceda lo necesario para producir ribosomas funcionales. De esta forma la velocidad de síntesis de proteínas r se mantiene en equilibrio con la disponibilidad de rRNA.

El sitio de unión del mRNA para el represor de la traducción está cerca del sitio de inicio de la traducción de uno de los genes del operón, generalmente el primer gen (Fig. 28–23). En otros operones se vería afectado sólo ese gen en particular, ya que en los mRNA policistrónicos bacterianos la mayoría de genes tienen señales de traducción independientes. Sin embargo, en los operones de proteínas r, la traducción de un gen depende de la traducción de todos los demás. El mecanismo de este acoplamiento de la traducción aún no se conoce en detalle. No obstante, en algunos casos la traducción de múltiples genes parece que se bloquea mediante el plegamiento del mRNA en una estructura tridimensional compleja que se estabiliza tanto por apareamiento interno (como en la Fig. 8–23) como por la unión de la proteína represora de la traducción. Cuando el represor de la traducción está ausente, la unión del ribosoma y la traducción de uno o más genes elimina la estructura plegada del mRNA, permitiendo que se traduzcan todos los genes.

Debido a que la síntesis de proteínas r está coordinada con la disponibilidad de los rRNA, la regulación de la producción de ribosomas refleja la regulación de la síntesis de rRNA. En *E. coli*, la síntesis de rRNA a partir de los siete operones de rRNA refleja la tasa de crecimiento celular y los cambios en la disponibilidad de nutrientes cruciales, especialmente aminoácidos. La regulación coordinada con las concentraciones de aminoácidos se denomina **respuesta grave (Fig. 28–24)**. Cuando las concentraciones de aminoácidos son bajas, la síntesis de rRNA se detiene. La deficiencia de aminoácidos provoca la unión de tRNA descargados al sitio A de los ribosomas; ello desencadena una secuencia de acontecimientos que empieza con la unión de un enzima denominado **factor de respuesta grave** (proteína RelA) al ribosoma. Cuando está unido al ribosoma, el factor de respuesta grave cataliza la formación del nucleótido poco común guanosina tetrafosfato (ppGpp; véase la Fig. 8–39), que añade pirofosfato a la posición 3′ del GTP, en la reacción

$$\text{GTP} + \text{ATP} \rightarrow \text{pppGpp} + \text{AMP}$$

A continuación una fosfohidrolasa elimina un fosfato para formar ppGpp. El aumento brusco del nivel de ppGpp en respuesta a la carencia de aminoácidos produce una gran reducción de la síntesis de rRNA, debida, al menos en parte, a la unión de ppGpp a la RNA polimerasa.

El nucleótido ppGpp, junto al cAMP, pertenece a una clase de nucleótidos modificados que actúan como segundos mensajeros celulares (pág. 298). En *E. coli*, estos dos nucleótidos sirven como señal de carencia de nutrientes, y causan grandes cambios en el metabolismo celular, aumentando o disminuyendo la transcripción de centenares de genes. En las células eucarióticas, nucleótidos similares que actúan de segundos mensajeros también tienen funciones de regulación múltiples. La coordinación del metabolismo celular con el crecimiento celular es muy compleja y sin duda otros mecanismos de regulación están por descubrir.

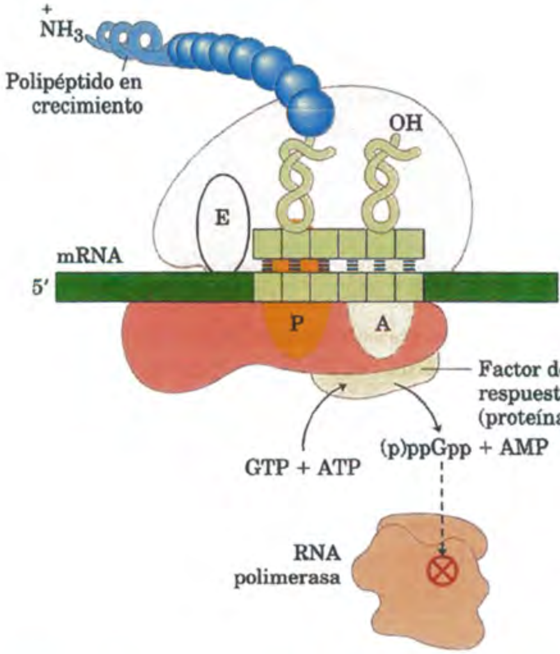


FIGURA 28–24 Respuesta grave en *E. coli*. Esta respuesta a la deficiencia de aminoácidos está provocada por la unión de un tRNA descargado en el sitio A del ribosoma. Una proteína denominada factor de respuesta grave se une al ribosoma y cataliza la síntesis de pppGpp, que es convertido en ppGpp por una fosfohidrolasa. El ppGpp señal reduce la transcripción de algunos genes e incrementa la de otros, en parte al unirse a la subunidad β de la RNA polimerasa, alterando la especificidad de promotor del enzima. La síntesis de rRNA se reduce cuando los niveles de ppGpp aumentan.

La función de algunos mRNA está regulada por pequeños RNA en *cis* o en *trans*

Tal como se describe a lo largo de este capítulo, las proteínas juegan un importante y bien documentado papel en la regulación de la expresión génica. Pero el RNA también juega un papel crucial, cada vez mejor reconocido a medida que se descubren nuevos casos de RNA reguladores. Una vez sintetizado un mRNA, sus funciones pueden ser controladas por proteínas de unión a RNA, como se ha visto en los operones de las proteínas r recién descritos, o por un RNA. Una molécula distinta de RNA puede unirse al mRNA "en *trans*" y afectar su actividad. Alternativamente, una parte del mismo mRNA puede regular su propia función. Cuando una parte de una molécula afecta la función de otra parte de la misma molécula, se dice que actúa "en *cis*".

Un ejemplo bien caracterizado de regulación de RNA en *trans* se observa en la regulación del mRNA del gen *rpoS* (factor sigma de la RNA polimerasa), que codifica σ^S, uno de los siete factores sigma de *E. coli* (véase la Tabla 26–1). La célula utiliza este factor de especificidad en ciertas situaciones de estrés, tal como la entrada en fase estacionaria (un estado de no crecimiento, forzado por la falta de nutrientes), en la cual σ^S es necesaria para la transcripción de un gran número de genes de respuesta al estrés. El mRNA de σ^S está presente en la mayoría de circunstancias a muy baja concentración, pero no es traducido porque una gran estructura en horquilla más arriba de la re-

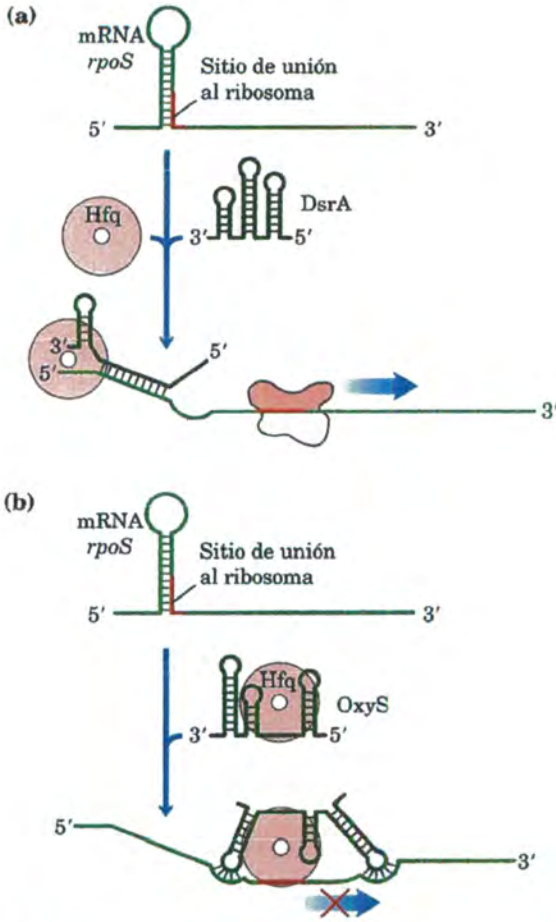


FIGURA 28–25 Regulación en trans de la función de los mRNA bacterianos por sRNA. Varios sRNA (pequeños RNA) —DsrA, RprA y OxyS— están implicados en la regulación del gen *rpoS*. Todos requieren la proteína Hfq, una chaperona de RNA que facilita el apareamiento RNA-RNA. La Hfq tiene una estructura toroidal con un orificio en el centro. **(a)** La DsrA activa la traducción apareándose con una hebra de una estructura en horquilla que bloquea el sitio de unión al ribosoma. RprA actúa de forma similar. **(b)** OxyS bloquea la traducción apareándose con el sitio de unión al ribosoma.

gión codificante impide su unión al ribosoma **(Fig. 28–25)**. En ciertas condiciones de estrés, se inducen uno o dos RNA pequeños de función especial, DsrA (región A corriente abajo) y RprA (RNA A regulador *Rpos*). Ambos pueden aparearse con una de las hebras de la horquilla en el mRNA de σ^S, desorganizándola y, en consecuencia, permitiendo la traducción de *rpoS*. Otro RNA pequeño, oxyS (gen S del estrés oxidativo), se induce en condiciones de estrés oxidativo e inhibe la traducción de *rpoS*, probablemente apareándose con el sitio de unión al ribosoma del mRNA. OxyS se expresa como parte de un sistema que responde a un tipo de estrés (daño oxidativo) distinto del que activa *rpoS*, y su tarea consiste en impedir la expresión de rutas de reparación innecesarias. DsrA, RprA y OxyS son moléculas de RNA bacteriano relativamente pequeñas (menos de 300 nucleótidos), designados como sRNA (obviamente existen otros RNA "pequeños" en los eucariotas con otras designaciones). Todos ellos requieren para su función una proteína denominada Hfq, una chaperona de RNA que facilita el apareamiento RNA-RNA. Los genes bacterianos conocidos regulados de esta forma son escasos, justo unas pocas docenas en una especie bacteriana típica. Sin embargo, estos ejemplos son buenos modelos para entender los patrones presentes en los más complejos y numerosos casos de regulación mediada por RNA que se producen en los eucariotas.

La regulación en *cis* pone en juego una clase de estructuras de RNA conocidas como **ribointerruptores.** Tal como se describe en el Recuadro 26–3, los aptámeros son moléculas de RNA generadas in vitro, que son capaces de unirse específicamente a un ligando en particular. Como sería de suponer, tales dominios de RNA de unión a ligandos también se encuentran en la naturaleza, en los ribointerruptores, en un número significativo de mRNA bacterianos (e incluso en algunos mRNA eucarióticos). Estos aptámeros naturales consisten en dominios estructurados localizados en la región 5′ no traducida de ciertos mRNA bacterianos. La unión de un mRNA ribointerruptor al ligando apropiado provoca un cambio de conformación en el mRNA, que inhibe la transcripción mediante la estabilización de una estructura de terminación de la transcripción prematura, o bien se inhibe (en *cis*) la traducción a consecuencia de la oclusión del sitio de unión al ribosoma **(Fig. 28–26)**.

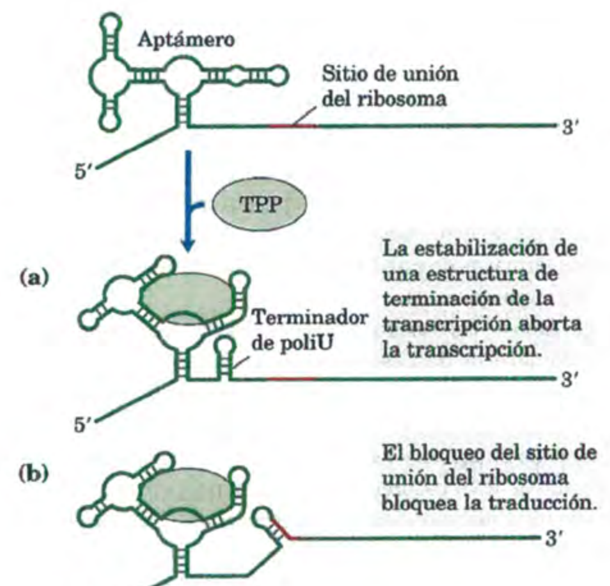


FIGURA 28–26 Regulación en *cis* de la función de los mRNA bacterianos por ribointerruptores. Los modos de acción conocidos se ilustran mediante varios ribointerruptores basados en un aptámero natural ampliamente distribuido que une tiamina pirofosfato. La unión de TTP al aptámero provoca un cambio de conformación que desemboca en los diversos resultados ilustrados en los paneles **(a)**, **(b)** y **(c)** en los diferentes sistemas que utilizan este aptámero.

En general, los ribointerruptores actúan como parte de un bucle de retroalimentación. La mayor parte de los genes regulados de esta forma están implicados en la síntesis o el transporte del ligando que se une el ribointerruptor; por tanto, cuando el ligando está presente en elevadas concentraciones, el ribointerruptor inhibe la expresión de los genes necesarios para reponerlo.

Cada ribointerruptor une un solo ligando. Se han encontrado diferentes ribointerruptores que responden a más de una docena de ligandos diferentes, entre los que se encuentran la tiamina pirofosfato (TPP, vitamina B_1), la cobalamina (vitamina B_{12}), la flavina mononucleótido, la lisina, la S-adenosilmetionina (adoMet), las purinas, la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato y la glicina. Es probable que se descubran muchos más. El ribointerruptor que responde a TTP parece ser el más difundido; se encuentra en muchas bacterias, hongos y algunas plantas. El ribointerruptor para el TTP bacteriano inhibe la traducción en algunas especies e induce la terminación prematura de la transcripción en otras (Fig. 28–26). El ribointerruptor para el TTP eucariótico se encuentra en los intrones de ciertos genes y modula el corte y empalme alternativo de estos genes (véase la Fig. 26–22). Todavía no está claro cuan abundantes son los ribointerruptores. Sin embargo, se ha calculado que más del 4% de los genes de *Bacillus subtilis* están regulados por ribointerruptores.

A medida que los ribointerruptores se conocen mejor, van encontrándose aplicaciones médicas. Por ejemplo, la mayoría de los ribointerruptores descritos hasta la fecha, incluido el que responde a adoMet, sólo se han encontrado en las bacterias. Un fármaco que fuese capaz de unirse y activar al ribointerruptor adoMet bloquearía los genes que codifican los enzimas que sintetizan y transportan adoMet, privando a las bacterias de este cofactor esencial. Se están investigando diversos fármacos de este tipo para utilizarlos como una nueva clase de antibióticos. ■

El ritmo de los descubrimientos sobre los RNA funcionales no da síntomas de desfallecimiento y continúa apoyando la hipótesis de que el RNA jugó un papel determinante en la evolución de la vida (Capítulo 26). Los sRNA y los ribointerruptores, así como los ribozimas y los ribosomas, pueden ser vestigios de un mundo de RNA oscurecido por el tiempo, pero todavía presente en un abundante conjunto de mecanismos biológicos en la biosfera actualmente existente. La selección de aptámeros en el laboratorio y los ribozimas con nuevas funciones enzimáticas y de unión de ligandos (véase el Recuadro 26–3) nos dicen que las actividades basadas en RNA, necesarias para la viabilidad de un mundo de RNA, son posibles. El descubrimiento de las mismas funciones del RNA en organismos distintos sugiere que los componentes clave para un metabolismo basado en el RNA existen efectivamente. Por ejemplo, los aptámeros naturales de los ribointerruptores pueden proceder de los RNA que hace miles de millones de años se unían a los cofactores necesarios para promover los procesos enzimáticos requeridos por el metabolismo en un mundo de RNA.

Algunos genes se regulan mediante recombinación genética

Describiremos a continuación otro tipo de regulación génica bacteriana, a nivel del reordenamiento del DNA por recombinación. *Salmonella typhimurium*, que vive en los intestinos de los mamíferos, se mueve haciendo girar los flagelos de su superficie celular **(Fig. 28–27)**. Las muchas copias de la proteína flagelina (M_r 53.000) que forman los flagelos son dianas preferentes de los sistemas inmunitarios de los mamíferos. Pero las células de *Salmonella* poseen un mecanismo que elude la respuesta inmune: alternan entre dos proteínas flagelina distintas (FljB y FliC) aproximadamente una vez cada 1.000 generaciones, utilizando un proceso denominado **variación de fase.**

FIGURA 28–27 *Salmonella typhimurium*, con flagelos aparentes.

El cambio se produce mediante la inversión periódica de un segmento de DNA que contiene el promotor de un gen de la flagelina. La inversión es una reacción de recombinación específica de sitio (véase la Fig. 25–41) en la que actúa la recombinasa denominada Hin sobre secuencias específicas de 14 pb (secuencias *hix*) en cada extremo del segmento de DNA. Cuando el segmento de DNA se encuentra en una orientación, se expresan el gen de la flagelina FljB y el gen que codifica un represor (FljA) **(Fig. 28–28a)**; el represor anula la expresión del gen de la flagelina FliC. Cuando se invierte el segmento de DNA (Fig. 28–28b), los genes *fljA* y *fljB* dejan de transcribirse y el gen *fliC* se induce a medida que desaparece el represor. La recombinasa Hin, codificada por el gen *hin* en el segmento de DNA que sufre la inversión, se expresa cuando el segmento de DNA está en cualquier orientación; por tanto, la célula siempre puede cambiar de un estado a otro.

Este tipo de sistema de regulación tiene la ventaja de ser absoluto: la expresión génica es imposible cuando el gen está físicamente separado de su promotor (véase la posición del promotor *fljB* en la Fig. 28–28b). Un mecanismo de arranque/parada absoluto puede ser importante en este sistema (aunque solamente afecte a uno de los dos genes de la flagelina), porque un flagelo con tan sólo una copia de flagelina incorrecta puede ser vulnerable a los anticuerpos del huésped dirigidos contra esta proteína. El sistema de *Salmonella* no es de ninguna manera único. Se dan sistemas de regulación similares en algunas bacterias y bacteriófagos, y se han encontrado sistemas de recombinación con funciones similares en eucariotas (Tabla 28–1). La regulación génica por reordenamientos del DNA que mueven genes y/o promotores es muy frecuente en patógenos que se benefician cambiando su gama de huéspedes o cambiando sus proteínas de superficie, adelantándose de este modo al sistema inmunitario del huésped.

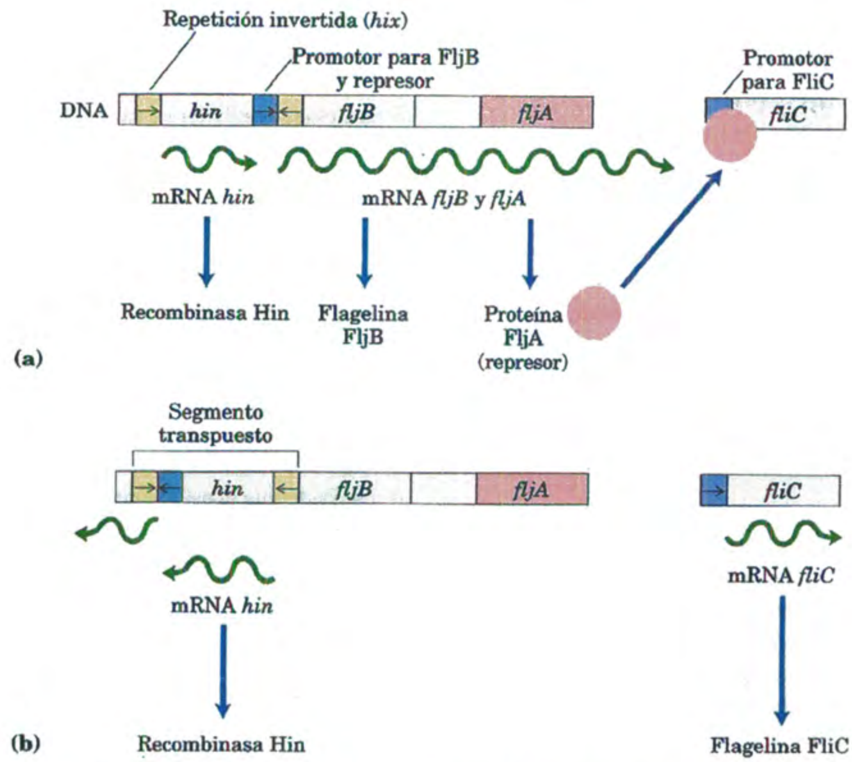


FIGURA 28–28 Regulación de los genes de la flagelina en *Salmonella:* variación de fase. Los productos de los genes *fliC* y *fljB* son flagelinas diferentes. El gen *hin* codifica la recombinasa que cataliza la inversión del segmento de DNA que contiene el promotor *fljB* y el gen *hin*. Los sitios de recombinación (repeticiones invertidas) se denominan *hix* (en amarillo). **(a)** En una orientación, *fljB* se expresa junto con una proteína represora (producto del gen *fljA*) que reprime la transcripción del gen *fliC*. **(b)** En la orientación opuesta sólo se expresa el gen *fliC*; los genes *fljA* y *fljB* no se pueden transcribir. La interconversión entre estos dos estados, denominada variación de fase, también requiere otras dos proteínas de unión al DNA no específicas (no mostradas), HU y FIS.

TABLA 28–1 Ejemplos de regulación génica por recombinación

Sistema	Recombinasa/ sitio de recombinación	Tipo de recombinación	Función
Variación de fase (*Salmonella*)	Hin/*hix*	Específica de sitio	La expresión alternativa de dos genes de la flagelina permite eludir la respuesta inmunitaria del huésped.
Gama de huéspedes (bacteriófago μ)	Gin/*gix*	Específica de sitio	La expresión alternativa de dos conjuntos de genes de la fibra de la cola afecta a la gama de huéspedes.
Cambio del tipo de apareamiento (levaduras)	Endonucleasa HO, proteína RAD52, otras proteínas/*MAT*	Conversión génica no recíproca*	La expresión alternativa de dos tipos de apareamiento de levaduras, a y α, crea células con diferentes tipos de apareamiento que se pueden aparear y experimentar meiosis.
Variación antigénica (tripanosomas)[†]	Varía	Conversión génica no recíproca*	La expresión sucesiva de diferentes genes que codifican las glucoproteínas de superficie variables (VSG) permite eludir la respuesta inmunitaria del huésped.

*En la conversión génica no recíproca (un tipo de proceso de recombinación no discutido en el Capítulo 25), la información genética se traslada de una parte del genoma (donde está silenciada) a otra (donde se expresa). La reacción es similar a la transposición replicativa (véase la Fig. 25-45).

[†]Los tripanosomas son agentes causales de la enfermedad del sueño africana y otras enfermedades (véase el Recuadro 22-3). La superficie externa de un tripanosoma contiene múltiples copias de un único VSG, el antígeno de superficie principal. Una célula puede cambiar los antígenos de superficie en más de 100 formas diferentes, imposibilitando una defensa efectiva por parte del sistema inmunitario del huésped.

RESUMEN 28.2 Regulación de la expresión génica en bacterias

- Además de la represión por el represor Lac, el operón *lac* de *E. coli* se regula positivamente por la proteína receptora de cAMP (CRP). Cuando la [glucosa] es baja, la [cAMP] es alta y la CRP-cAMP se une a un sitio específico del DNA, estimulando la trascripción del operón *lac* y la producción de los enzimas del metabolismo de la lactosa. La presencia de glucosa disminuye la [cAMP], que disminuye la expresión de *lac* y otros genes implicados en el metabolismo de azúcares secundarios. Un grupo de operones regulados de manera coordinada se denomina regulón.
- Los operones de los enzimas de la síntesis de aminoácidos poseen un circuito regulador denominado atenuación, que utiliza un sitio de terminación de la trascripción (el atenuador) en el mRNA. La formación del atenuador está modulada por un mecanismo que acopla la trascripción y la traducción en respuesta a pequeños cambios en la concentración de aminoácidos.
- En el sistema SOS, múltiples genes no ligados reprimidos por un único represor se inducen simultáneamente cuando las lesiones del DNA desencadenan el corte autocatalítico del represor asistido por la proteína RecA.
- En la síntesis de las proteínas ribosómicas, una proteína de cada operón de proteína r actúa como represor de la traducción. El represor se une al mRNA, bloqueando la traducción, sólo cuando la proteína r se encuentra en exceso en relación con el rRNA disponible.
- La regulación postranscripción de algunos mRNA esta facilitada por sRNA que actuan en *trans* o por ribointerruptores, que son parte de la propia estructura del mRNA, que actúan en *cis*.
- Algunos genes están regulados por procesos de recombinación genética que mueven los promotores en relación con los genes regulados. La regulación también puede tener lugar a nivel de la traducción.

28.3 Regulación de la expresión génica en eucariotas

El inicio de la transcripción es un punto de regulación fundamental de la expresión génica en todos los organismos. A pesar de que algunos de los mecanismos de regulación se utilizan tanto en los eucariotas como en las baterias, la regulación de la transcripción en los dos sistemas es fundamentalmente distinta.

La transcripción basal in vivo puede definirse como la actividad inherente de los promotores y del mecanismo de transcripción in vivo en ausencia de secuencias de regulación. En las bacterias, la RNA polimerasa generalmente tiene acceso a todos los promotores y puede unirse e iniciar la transcripción con cierto nivel de eficiencia en ausencia de activadores o represores. El estado de transcripción basal es, por tanto, no restrictivo. Por el contrario, los promotores eucarióticos fuertes se encuentran por lo general inactivos in vivo en ausencia de proteínas reguladoras; es decir, el estado de transcripción basal es restrictivo. Esta diferencia fundamental da lugar al menos a cuatro características importantes que distinguen la regulación de la expresión génica en eucariotas de la de las bacterias.

Primero, el acceso a los promotores eucarióticos está restringido por la estructura de la cromatina y la activación de la transcripción está asociada con múltiples cambios en la estructura de la cromatina en la región transcrita. Segundo, a pesar de que en las células eucarióticas se encuentran tanto elementos de regulación positiva como negativa, los mecanismos positivos predominan en todos los sistemas caracterizados hasta la fecha. Dado que el estado de transcripción basal es restrictivo, casi todos los genes eucarióticos requieren activación para ser transcritos. Tercero, las células eucarióticas tienen proteínas reguladoras multiméricas más grandes y complejas que las bacterias. Por último, la transcripción en el núcleo eucariótico está separada tanto en el espacio como en el tiempo de la traducción en el citoplasma.

Tal y como veremos más adelante, la complejidad de los circuitos de regulación que se observa en las células eucarióticas es extraordinaria. Concluiremos con una descripción ilustrada de la complicada cascada de regulación que controla el desarrollo de la mosca del vinagre.

La cromatina transcripcionalmente activa es estructuralmente diferente de la cromatina inactiva

Los efectos de la estructura cromosómica en la regulación génica en los eucariotas no tienen una correspondencia clara en las bacterias. En el ciclo celular de los eucariotas, los cromosomas interfásicos tienen a primera vista una apariencia dispersa y amorfa (véanse las Figs. 12–43 y 24–25). Sin embargo, se pueden encontrar diversas formas de cromatina a lo largo de los cromosomas. En una célula eucariótica típica, alrededor del 10% de la cromatina se encuentra en un estado más condensado que el resto de la cromatina. Esta forma, la **heterocromatina,** es transcripcionalmente inactiva. La heterocromatina está asociada generalmente a estructuras cromosómicas definidas, como por ejemplo los centrómeros. La cromatina restante, menos condensada, se denomina **eucromatina.**

La transcripción de un gen eucariótico está fuertemente reprimida cuando su DNA está condensado en la heterocromatina. Una parte de la eucromatina, pero no toda, es transcripcionalmente activa. Las regiones cromosómicas transcripcionalmente activas se caracterizan no sólo por una estructura de la cromatina más abierta sino también por la presencia de nucleosomas con modificaciones y composición específicas. La cromatina transcripcionalmente activa presenta un déficit de histona H1, que se une al DNA internucleosomal y está enriquecida en las variantes de las histonas H3.3 y H2AZ (véase el Recuadro 24–2).

Las histonas de la cromatina transcripcionalmente activa y de la heterocromatina también difieren en sus patrones de modificación covalente. Las histonas internas de los nucleosomas (H2A, H2B, H3 y H4; véase la Fig. 24–27) se modifican por metilación de residuos Lys o Arg, fosforilación de residuos Ser o

Thr, acetilación (véase más adelante) ubiquitinación (véase la Fig. 27–47) o sumilación. Cada una de las histonas internas posee dos dominios estructurales distintos. Un dominio central está implicado en las interacciones histona-histona y en el enrollamiento del DNA alrededor del nucleosoma. Un segundo dominio amino-terminal rico en lisina se encuentra generalmente en el exterior del nucleosoma; las modificaciones covalentes se producen en residuos específicos concentrados en el dominio amino-terminal. Los patrones de modificación han hecho suponer la existencia de un código de histonas, en el que los patrones de modificación serían reconocidos por enzimas que alteran la estructura de la cromatina. Las modificaciones asociadas con la activación transcripcional, principalmente metilación y acetilación, serían reconocidas por enzimas que hacen que la cromatina sea más accesible a la maquinaria de la trascripción. En efecto, algunas de las modificaciones son esenciales para la interacción con proteínas que juegan un papel clave en la transcripción.

La metilación en posición 5′ de los residuos citosina de las secuencias CpG es frecuente en el DNA eucariótico (pág. 292), pero el DNA de la cromatina transcripcionalmente activa tiende a estar poco metilado. Además, los sitios CpG de genes particulares están a menudo menos metilados en las células de los tejidos donde esos genes se expresan que en aquellos en que no se expresan. El modelo global sugiere que la cromatina activa se prepara para la transcripción mediante la eliminación de barreras estructurales potenciales.

La cromatina se remodela por acetilación y desplazamiento/reposicionamiento de los nucleosomas

El conjunto de cambios estructurales de la cromatina asociados a la transcripción se generan mediante un proceso denominado **remodelación de la cromatina.** La remodelación pone en juego enzimas que promueven los cambios antes descritos. Algunos enzimas modifican covalentemente las histonas del nucleosoma. Otros utilizan la energía química del ATP para reposicionar los nucleosomas en el DNA (Tabla 28–2). Otros, finalmente, alteran la composición en histonas de los nucleosomas.

La acetilación y la metilación de las histonas juegan un papel destacado en los procesos de activación de la cromatina para la trascripción. Tal como se ha indicado anteriormente, los dominios amino-terminales de las histonas internas son generalmente ricos en residuos Lys y Arg. Durante la transcripción, la histona H3 es metilada (por metilasas específicas de histonas) en los nucleosomas en la Lys^{4} cerca del extremo 5′ de la región codificante y en la Lys^{36} a lo largo de toda la región codi-

TABLA 28–2 Algunos complejos enzimáticos que catalizan cambios estructurales en la cromatina durante la transcripción

Complejo enzimático*	Estructura oligomérica (número de polipéptidos)	Origen	Actividades
Modificación de histonas			
GCN5-ADA2-ADA3	3	Levadura	GCN5 tiene la actividad HAT tipo A
SAGA/PCAF	>20	Eucariotas	Incluye GCN5-ADA2-ADA3; acetila residuos en H3 y H2B
NuA4	Al menos 12	Eucariotas	El componente EsaI tiene actividad HAT; acetila H4, H2A y H2AZ
Movimiento/reemplazamiento de histonas por enzimas que requieren ATP			
SWI/SNF	≥6; total M_r 2×10^6	Eucariotas	Remodelación del nucleosoma; activación de la transcripción
Familia ISWI	Varía	Eucariotas	Remodelación del nucleosoma; represión de la transcripción; en algunos casos activación de la transcripción (NURF)
Familia SWR1	~12	Eucariotas	Descarga de H2AZ
Chaperonas de histonas que no requieren ATP			
HIRA	1	Eucariotas	Descarga de H3.3 durante la transcripción

*Las abreviaturas utilizadas para identificar genes eucarióticos y proteínas son a menudo más confusas u oscuras que las utilizadas en bacterias. El complejo formado por GCN5 (control general *no* desreprimible) y las proteínas ADA (*al*teración/*d*eficiencia *a*ctivación) fue descubierto durante la investigación de la regulación de los genes del metabolismo del nitrógeno en levaduras. Estas proteínas pueden ser parte del complejo SAGA mayor (*SPF, ADA2,3, GCN5, a*cetiltransferasa) de levaduras. Su equivalente en humanos es PCAF (*p*300/*f*actor *a*sociado a *C*BP). NuA4 es la H4 acetiltransferasa del nucleosoma; ESA1 es una acetiltransferasa esencial relacionada con SAS2. SWI fue descubierta como una proteína necesaria para la expresión de ciertos genes implicados en el cambio del tipo de apareamiento en levaduras, y SNF (*s*acarosa *no f*ermentable) como un factor para la expresión del gen de levaduras para la sacarasa. Estudios posteriores descubrieron múltiples proteínas SWI y SNF que actuaban en forma de complejo. El complejo SWI/SNF desempeña un papel en la expresión de una amplia gama de genes y se ha encontrado en muchos eucariotas, incluidos los humanos. ISWI es un análogo de SWI; NURF es un *f*actor de *r*eestructuración *nu*clear; SWR1 es la ATPasa1 *r*elacionada con *Sw*i2/Snf2, y HIRA es el *r*egulador *A* de *hi*stonas.

ficante. Estas metilaciones facilitan la unión de **histona acetiltransferasas (HAT),** enzimas que acetilan residuos Lys específicos. Las HAT citosólicas (tipo B) acetilan histonas recién sintetizadas antes de que sean importadas por el núcleo. El posterior ensamblaje de las histonas en cromatina está facilitado por chaperonas de histonas: CAF1 para la H3 y la H4, y NAP1 para la H2A y la H2B (véase el Recuadro 24–2).

Allí donde la cromatina está siendo activada para la transcripción, las histonas del nucleosoma se acetilan aún más por HAT nucleares (tipo A). La acetilación de múltiples residuos Lys en los dominios amino-terminales de las histonas H3 y H4 puede reducir la afinidad del nucleosoma completo hacia el DNA. La acetilación de residuos Lys concretos es crítica para la interacción del nucleosoma con otras proteínas. Cuando la transcripción de un gen ya no es necesaria, la acetilación de los nucleosomas en la región donde se encuentra disminuye por acción de las **histona desacetilasas (HDAC),** como parte del proceso general de silenciación de genes que restablece el estado transcripcionalmente inactivo de la cromatina. Además de la eliminación de determinados grupos acetilo, nuevas modificaciones covalentes de las histonas marcan la cromatina como transcripcionalmente inactiva. A modo de ejemplo, el residuo Lys^9 de la histona H3 se encuentra a menudo metilada en la heterocromatina.

Se conocen cinco familias de complejos enzimáticos que mueven o desplazan activamente los nucleosomas, con hidrólisis concomitante de ATP, tres de las cuales son especialmente importantes en la activación de la transcripción (Tabla 28–2; véase la nota al pie de la tabla para la descripción de las abreviaturas de los complejos enzimáticos aquí descritos). El complejo **SWI/SNF,** presente en todas las células eucarióticas, contiene como mínimo seis polipéptidos principales, que juntos remodelan la cromatina de forma que los nucleosomas quedan espaciados más irregularmente y estimulan la unión de factores de transcripción. El complejo incluye un componente denominado bromodominio cerca del extremo carboxilo-terminal de la subunidad ATPasa, que interacciona con las colas acetiladas de las histonas. SWI/SNF no se necesita para la transcripción de todos los genes. **NURF,** miembro de la familia ISW1, remodela la cromatina de manera que complementa y solapa la actividad de SWI/SNF. Estos dos complejos enzimáticos son cruciales en la preparación de una región de la cromatina para la transcripción activa. Algunos miembros de una tercera familia, **SWR1,** están implicados en la descarga de la histona variante H2AZ en la cromatina transcripcionalmente activa.

Otras familas de complejos de remodelación de la cromatina están implicadas en el reordenamiento de los nucleosomas en la cromatina cuando los genes son silenciados. El efecto final de la remodelación de la cromatina consiste en aumentar la accesibilidad y en "marcar" (modificar químicamente) un segmento de cromatina para facilitar la unión y la actividad de los factores de transcripción que regulan la expresión del gen o de los genes que allí se encuentran.

Muchos promotores eucarióticos se regulan positivamente

Como se ha indicado anteriormente, las RNA polimerasas eucarióticas tienen poca o ninguna afinidad intrínseca por sus promotores; el inicio de la transcripción es casi siempre dependiente de la acción de múltiples proteínas activadoras. Una razón de peso del aparente predominio de la regulación positiva parece obvia: el empaquetamiento del DNA en la cromatina hace que la mayoría de promotores sean inaccesibles; por tanto, los genes normalmente permanecen silenciosos en ausencia de regulación de otro tipo. La estructura de la cromatina afecta el acceso a algunos promotores más que a otros, pero la presencia de represores que se unen al DNA para imposibilitar el acceso de la RNA polimerasa (regulación negativa) sería a menudo simplemente redundante. Otros factores pueden favorecer la utilización de la regulación positiva; dos de ellos se consideran generalmente como más importantes: el gran tamaño de los genomas eucarióticos y la mayor eficiencia de la regulación positiva.

Primero, la unión no específica de proteínas reguladoras al DNA se convierte en un problema más importante en los grandes genomas de los eucariotas superiores, pues la posibilidad de que una determinada secuencia de unión específica se encuentre al azar en un sitio inapropiado también aumenta con el tamaño del genoma. Se puede mejorar la especificidad de la activación de la transcripción si diversas proteínas reguladoras positivas se tienen que unir a secuencias específicas de DNA y formar un complejo para volverse activas. El número promedio de sitios de regulación de los genes de un organismo multicelular es de probablemente cinco como mínimo. El requisito que múltiples proteínas reguladoras positivas tengan que unirse a secuencias específicas de DNA reduce enormemente la probabilidad de que se produzca al azar la yuxtaposición funcional de todos los sitios de unión necesarios. En principio, se podría utilizar una estrategia similar con múltiples elementos de regulación negativa, pero esta consideración nos remite a la segunda razón para la utilización de la regulación positiva: sencillamente es más eficiente. Si los ~29.000 genes del genoma humano se regulasen negativamente, cada célula debería sintetizar en todo momento el mismo número de represores diferentes (o muchas veces ese número si se utilizasen en cada promotor múltiples elementos de regulación) en concentraciones suficientes que permitiesen la unión específica a cada uno de los genes "no deseados". En la regulación positiva, la mayoría de los genes están normalmente inactivos (es decir, las RNA polimerasas no se unen a los promotores) y las células tienen que sintetizar solamente las proteínas activadoras necesarias para promover la transcripción del subconjunto de genes necesarios para esa célula en un determinado momento. A pesar de estos argumentos, como veremos, hay ejemplos de regulación negativa en los eucariotas, desde las levaduras hasta los humanos.

Activadores y coactivadores de unión al DNA facilitan el ensamblaje de los factores de transcripción generales

Para continuar nuestra exploración de la regulación de la expresión génica en los eucariotas, volveremos a examinar las interacciones entre los promotores y la RNA polimerasa II (Pol II), el enzima responsable de la síntesis de los mRNA eucarióticos. Aunque la mayoría de promotores (pero no todos) de la RNA polimerasa II incluyen la secuencia TATA y las secuencias Inr (iniciador) con sus espaciados estándar (véase la Fig. 26–9), éstos varían mucho en el número y en la localización de secuencias adicionales necesarias para la regulación de la trans-

cripción. Estas secuencias reguladoras adicionales se denominan a menudo **intensificadores** en los eucariotas superiores y **secuencias activadoras corriente arriba (UAS)** en levaduras. Un intensificador típico se puede encontrar a centenares o incluso a miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción, o incluso puede encontrarse más abajo, dentro del propio gen. Cuando está unido a las proteínas reguladoras apropiadas, un potenciador aumenta la transcripción de los promotores cercanos, independientemente de su orientación en el DNA. Las UAS de las levaduras funcionan de manera similar, aunque generalmente tienen que estar situados corriente arriba y a no más de unos pocos centenares de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor de RNA polimerasa II puede estar afectado por media docena de estas secuencias reguladoras como promedio, pero son comunes los promotores todavía más complejos (por ejemplo, véase la Fig. 15–23).

La unión eficaz del holoenzima activo de la RNA polimerasa II a uno de sus promotores necesita normalmente la participación de otras proteínas **(Fig. 28–29)** de cuatro tipos distintos: (1) **activadores de la transcripción,** que se unen a los potenciadores o a UAS y facilitan la trascripción; (2) **proteínas de modificación y remodelación de la cromatina,** descritas anteriormente; (3) **coactivadores,** y (4) **factores de transcripción basal** (véase la Fig. 26–10, Tabla 26–2), necesarios en todos los promotores de RNA polimerasa II. Los coactivadores actúan indirectamente, no mediante la unión al DNA, y son necesarios para la comunicación entre los activadores y el complejo formado por la Pol II y los factores de transcripción basales (o generales). Además, diversas proteínas represoras pueden interferir en la comunicación entre la RNA polimerasa y los activadores, con el resultado de la represión de la transcripción (Fig. 28–29b). A continuación nos centraremos en los complejos proteicos que se muestran en la Figura 28–29 y en como interaccionan para activar la transcripción.

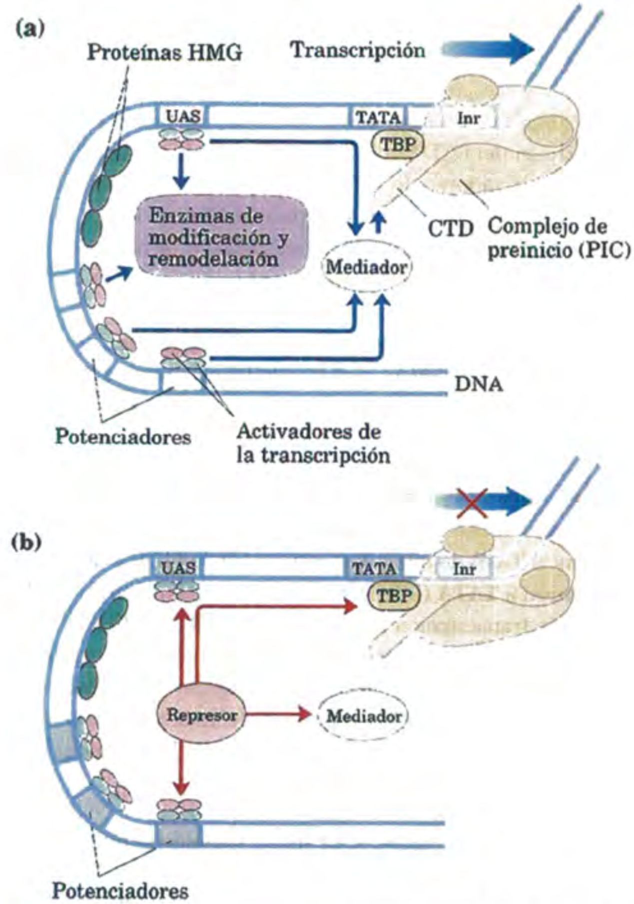


FIGURA 28–29 Promotores eucarióticos y proteínas reguladoras. La RNA polimerasa II y sus factores de transcripción generales asociados forman un complejo de preinicio en la secuencia TATA y en el sitio Inr de los promotores afines, un proceso facilitado por los activadores de la transcripción, que actúan mediante un mediador. **(a)** Aquí se muestra un promotor compuesto con elementos de secuencia típicos y complejos proteicos, que se han encontrado tanto en levaduras como en eucariotas superiores. El dominio carboxilo-terminal (CTD) de la Pol II (véase la Fig. 26–10) es un importante punto de interacción con el mediador y otros complejos proteicos. Los enzimas de modificación de histonas catalizan la metilación y la acetilación; los enzimas de remodelación alteran el contenido y la localización de los nucleosomas. Para los activadores de la transcripción, los dominios de unión al DNA se muestran en verde y los dominios de activación en rosa. Las interacciones simbolizadas por flechas azules se discuten en el texto. **(b)** Los represores de la transcripción eucarióticos funcionan a través de mecanismos diversos. Algunos se unen directamente al DNA, desplazando un complejo proteico necesario para la activación; otros interaccionan con varias partes de los complejos de transcripción o de activación para impedir la activación. Los posibles puntos de interacción se indican mediante flechas rojas.

Activadores de la transcripción Los requerimientos de activadores varían mucho de un promotor a otro. Se conocen algunos activadores que facilitan la transcripción de centenares de promotores, mientras que otros son específicos de unos pocos promotores. Muchos activadores son sensibles a la unión de moléculas señal, que proporcionan la capacidad de activar o desactivar la transcripción en respuesta a un cambio en el ambiente celular. Algunos potenciadores unidos a activadores están bastante distantes de la secuencia TATA del promotor. ¿Cómo funcionan a distancia los activadores? La respuesta en la mayoría de casos parece ser que, como se ha indicado anteriormente, el DNA interpuesto forma un lazo, de manera que varios complejos proteicos pueden interaccionar directamente. La formación del lazo está facilitada por ciertas proteínas no histonas que son abundantes en la cromatina y que se unen de forma no específica al DNA. Estas proteínas del **grupo de alta movilidad (HMG)** (Fig. 28–29; "alta movilidad" se refiere a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida) desempeñan un papel estructural importante en la remodelación de la cromatina y en la activación de la transcripción.

Complejos proteicos coactivadores La transcripción requiere casi siempre la presencia de complejos proteicos adicionales. Algunos de los complejos proteicos reguladores principales que interaccionan con la Pol II se han definido tanto genética como bioquímicamente. Estos complejos coactivadores actúan como intermedios entre los activadores de la transcripción y el complejo de Pol II.

El principal coactivador eucariótico contiene entre 20 y 30 polipéptidos, o más, que forman un complejo proteico denominado **mediador** (Fig. 28–29); muchos de los 20 polipéptidos principales están muy conservados, desde los hongos a los humanos. Un complejo adicional de cuatro subunidades puede interaccionar con el mediador e inhibir el inicio de la transcrip-

ción. El mediador se une fuertemente al dominio carboxilo-terminal (CTD) de la subunidad grande de la Pol II. El complejo mediador es necesario tanto para la transcripción basal como para la regulada en los promotores de Pol II y también estimula la fosforilación del CTD por TFIIH (un factor de transcripción basal). Los activadores de la transcripción interaccionan con uno a más componentes del complejo mediador. Los sitios precisos de interacción difieren de un activador a otro. Los complejos coactivadores funcionan en o cerca de la secuencia TATA del promotor.

Se han descrito otros coactivadores adicionales que funcionan con uno o unos pocos genes. Algunos actúan conjuntamente con el mediador, mientras que otros pueden actuar en sistemas que no usan mediador.

Proteína de unión a TATA El primer componente que se une en el ensamblaje de un **complejo de preinicio (PIC)** en la secuencia TATA de un típico promotor de Pol II es la **proteína de unión a TATA (TBP).** El complejo completo incluye los factores de transcripción basales TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH; Pol II, y, tal vez, TFIIA. Sin embargo, este PIC mínimo a menudo no es suficiente para el inicio de la transcripción y generalmente no se forma en absoluto si el promotor está ocluido en la cromatina. La regulación positiva que conduce a la transcripción depende de activadores y coactivadores.

Coreografía de la activación de la transcripción Ahora podemos empezar a ordenar la secuencia de sucesos de la activación de la transcripción en un promotor de Pol II típico **(Fig. 28–30)**. El orden exacto de la unión de algunos componentes puede variar, pero el modelo de la Figura 28–30 ilustra los principios de la activación así como una ruta común. Muchos activadores de la transcripción tienen una afinidad significativa por sus sitios de unión, incluso si estos sitios se encuentran en el interior de cromatina condensada. La unión de activadores es a menudo el suceso que desencadena la activación del promotor. La unión de un activador puede permitir la unión de otros, que desplaza gradualmente algunos nucleosomas.

La obligada remodelación de la cromatina se lleva a cabo por etapas, facilitada por interacciones entre activadores y HAT o complejos enzimáticos tales como SWI/SNF (o ambos). De esta manera, la unión de un activador puede atraer a otros componentes necesarios para una más profunda remodelación de la cromatina que permita la transcripción de genes específicos. Los activadores unidos interaccionan con el gran complejo mediador. El mediador a su vez suministra una superficie de ensamblaje para la unión primero de TBP (o TFIID), después de TFIIB y finalmente de otros componentes del PIC, incluida la RNA polimerasa II. El mediador estabiliza la unión de la Pol II y sus factores de transcripción asociados y facilita mucho la formación del PIC. La complejidad en estos circuitos de regulación es una norma más que una excepción, con múltiples activadores unidos al DNA que promueven la transcripción.

El guión puede cambiar de un promotor a otro, pero la mayoría de promotores parecen requerir un ensamblaje ordenado de los componentes para iniciar la transcripción. El proceso de ensamblaje no siempre es rápido. En algunos genes puede durar minutos, mientras que en ciertos genes de los eucariotas superiores puede durar días.

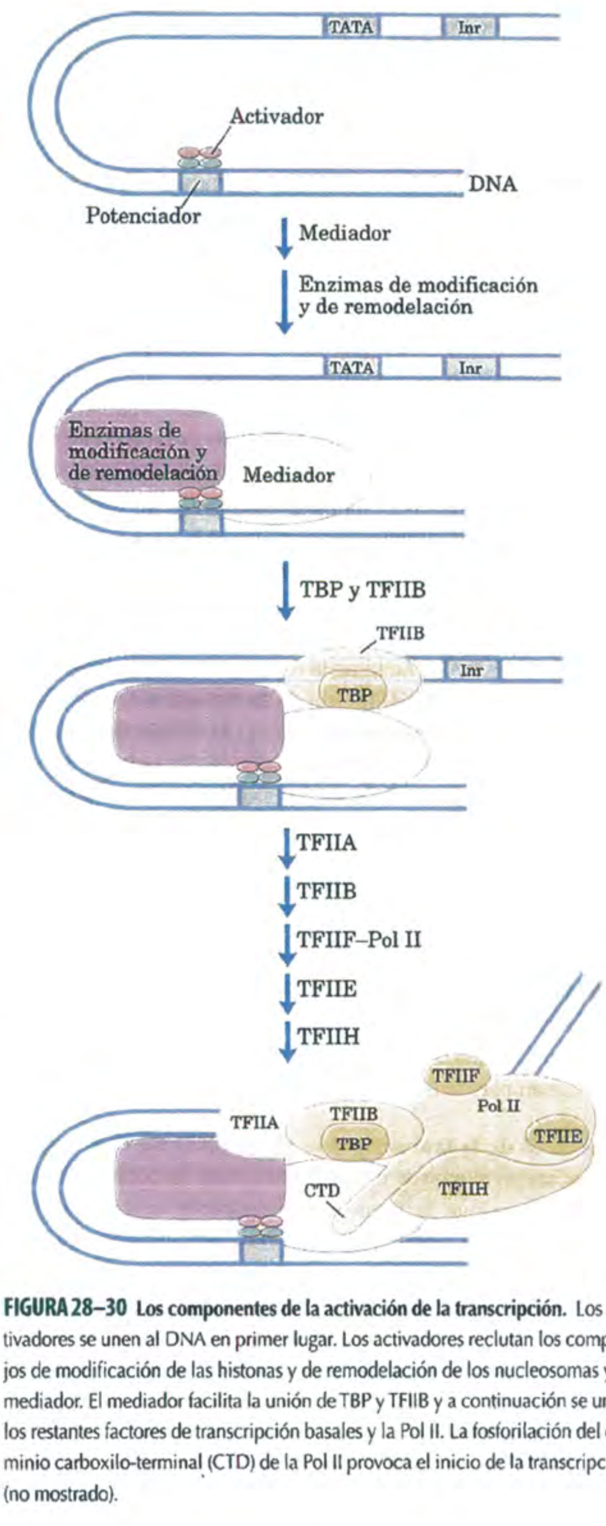


FIGURA 28–30 Los componentes de la activación de la transcripción. Los activadores se unen al DNA en primer lugar. Los activadores reclutan los complejos de modificación de las histonas y de remodelación de los nucleosomas y el mediador. El mediador facilita la unión de TBP y TFIIB y a continuación se unen los restantes factores de transcripción basales y la Pol II. La fosforilación del dominio carboxilo-terminal (CTD) de la Pol II provoca el inicio de la transcripción (no mostrado).

Activación de la transcripción reversible Aunque no es frecuente, algunas proteínas reguladoras eucarióticas que se unen a los promotores de Pol II pueden actuar como represores, inhibiendo la formación de PIC activos (Fig. 28–29b). Algunos activadores pueden adoptar diferentes conformaciones, que los capacitan para actuar como activadores o represores de la transcripción. Por ejemplo, algunos receptores de hormonas esteroideas (descritos más adelante) funcionan en el núcleo como activadores de la transcripción, estimulando la transcripción de ciertos genes cuando está presente una señal

hormonal esteroide determinada. En ausencia de la hormona, las proteínas receptoras revierten a una conformación que actúa de represor, *impidiendo* la formación de los PIC. En algunos casos, esta represión implica la interacción con histona desacetilasas y otras proteínas que ayudan a restablecer el estado transcripcionalmente inactivo de la cromatina circundante. El mediador, cuando incluye las subunidades inhibidoras, también puede bloquear el inicio de la transcripción. Este mecanismo regulador puede asegurar el ensamblaje ordenado del PIC (demorando la activación de la transcripción hasta que todos los factores requeridos estén presentes) o puede ser un mecanismo que ayude a desactivar los promotores una vez que la transcripción ya no sea necesaria.

Los genes del metabolismo de la galactosa en las levaduras están sujetos tanto a regulación positiva como negativa

Algunos de los principios generales descritos anteriormente se pueden ilustrar mediante un circuito regulador eucariótico muy bien estudiado **(Fig. 28–31)**. Los enzimas necesarios para la importación y el metabolismo de la galactosa en levaduras están codificados por genes dispersos en varios cromosomas (Tabla 28–3). Cada uno de los genes *GAL* se transcribe separadamente y las células de levadura no tienen operones como los de las bacterias. Sin embargo, todos los genes *GAL* tienen promotores similares y están regulados de forma coordinada por un conjunto común de proteínas.

Los promotores para los genes *GAL* consisten en la secuencia TATA y las secuencias Inr, así como una secuencia activadora en el lado 5′ (UAS_G) reconocida por la proteína activadora de la transcripción Gal4 (Gal4p). La regulación de la expresión génica por parte de la galactosa implica una interacción entre Gal4p y otras dos proteínas, Gal80p y Gal3p (Fig. 28–31). Gal80p forma un complejo con Gal4p, que impide

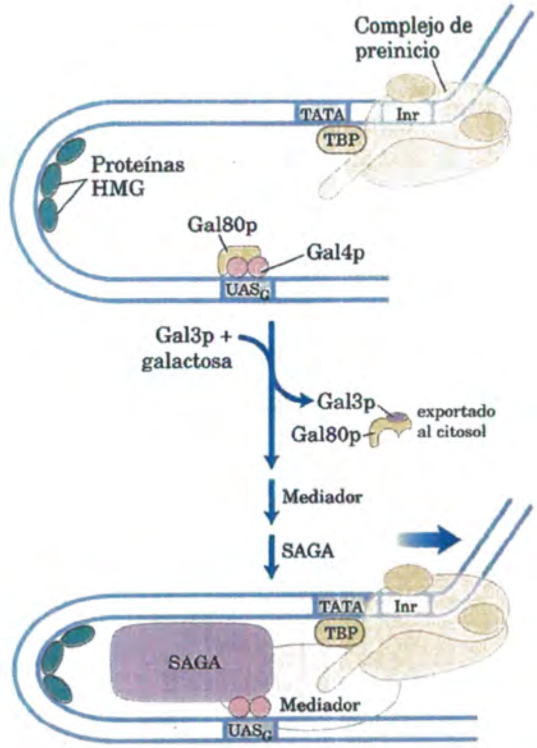


FIGURA 28–31 Regulación de la transcripción de los genes *GAL* en levaduras. La galactosa es importada al interior de la célula y se convierte en galactosa 6-fosfato por una ruta que consta de seis enzimas, cuyos genes están distribuidos en tres cromosomas (véase la Tabla 28–3). La transcripción de estos genes se regula por la acción combinada de las proteínas Gal4p, Gal80p y Gal3p, con Gal4p desempeñando el papel central como activador de la transcripción. El complejo Gal4p-Gal80p es inactivo. La unión de la galactosa a Gal3p y su interacción con Gal80p produce un cambio de conformación en Gal80p. El complejo Gal3p-Gal80p es entonces exportado fuera del núcleo, lo que hace posible que Gal4p reclute el mediador y el complejo SAGA y actúe en la activación de la transcripción.

TABLA 28–3 Genes del metabolismo de la galactosa en levaduras

	Función proteica	Localización cromosómica	Tamaño de la proteína (número de residuos)	Expresión proteica relativa en diferentes fuentes de carbono: Glucosa	Glicerol	Galactosa
Genes regulados						
GAL1	Galactoquinasa	II	528	–	–	+ + +
GAL2	Galactosa permeasa	XII	574	–	–	+ + +
PGM2	Fosfoglucomutasa	XIII	569	+	+	+ +
GAL7	Galactosa 1-fosfato uridiltransferasa	II	365	–	–	+ + +
GAL10	UDP-glucosa 4-epimerasa	II	699	–	–	+ + +
MEL1	α-Galactosidasa	II	453	–	+	+ +
Genes reguladores						
GAL3	Inductor	IV	520	–	+	+ +
GAL4	Activador de la transcripción	XVI	881	+/–	+	+
GAL80	Inhibidor de la transcripción	XIII	435	+	+	+ +

Fuente: Adaptado de Reece, R. & Platt, A. (1997) Signaling activation and repression of RNA polymerase II transcription in yeast. *Bioessays* 19, 1001–1010.

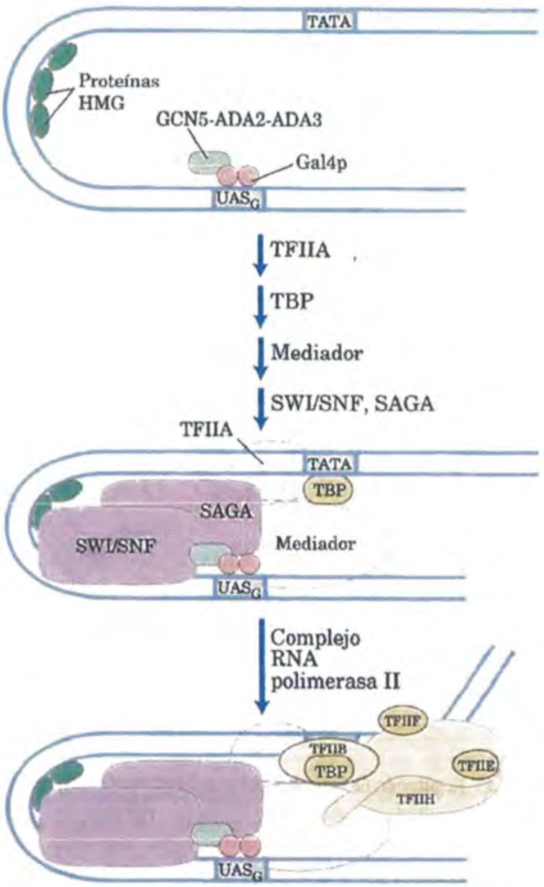


FIGURA 28–32 Complejos proteicos implicados en la activación de la transcripción de un grupo de genes eucarióticos relacionados. El sistema *GAL* ilustra la complejidad de este proceso, pero todavía no se sabe si todos estos complejos proteicos afectan la transcripción del gen *GAL*. Obsérvese que muchos de los complejos (tales como SWI/SNF, GCN5-ADA2-ADA3 y mediador) influyen en la transcripción de muchos genes. Los complejos se ensamblan paso a paso, como se muestra en la Fig. 28–30.

que Gal4p funcione como un activador de los promotores *GAL*. Cuando la galactosa está presente, se une a Gal3p, que entonces interacciona con Gal80p, liberando Gal4p para que actúe de activador en los diferentes promotores *GAL*.

Otros complejos proteicos también desempeñan un papel en la activación de la transcripción de los genes *GAL*. Entre ellos se encuentran el complejo SAGA para la acetilación de histonas, el complejo SWI/SNF para la remodelación de las histonas y el complejo mediador. La proteína Gal4p, cuando no está unida a Gal80p, es responsable de la atracción de estos factores adicionales necesarios para la activación de la transcripción. La **Figura 28–32** da una idea de la complejidad de las interacciones proteicas en el proceso global de la activación de la transcripción en las células eucarióticas.

La glucosa es la fuente de carbono preferida por las levaduras, al igual que por las bacterias. Cuando la glucosa está presente, la mayoría de los genes *GAL* están reprimidos, tanto si la galactosa está presente como si no. El sistema regulador de *GAL* descrito anteriormente es anulado de forma eficaz por un complejo sistema de represión por catabolito que consta de varias proteínas (no representado en la Figura 28–32).

Los activadores de la transcripción tienen una estructura modular

Los activadores de la transcripción tienen normalmente un dominio estructural distinto para la unión específica al DNA y uno o más dominios adicionales para la activación de la transcripción o para la interacción con otras proteínas reguladoras. La interacción de dos proteínas reguladoras está a menudo mediada por dominios que contienen cremalleras de leucina (Fig. 28–14) o motivos hélice-lazo-hélice (Fig. 28–15). Aquí consideraremos tres tipos distintos de dominios estructurales utilizados en la activación por activadores de la transcripción (**Fig. 28–33a**): Gal4p, Sp1 y CTF1.

Gal4p contiene una estructura parecida a un dedo de zinc en su dominio de unión al DNA cerca del extremo amino; este dominio tiene seis residuos Cys que coordinan dos Zn^{2+}. La proteína funciona como un homodímero (con la dimerización debida a las interacciones entre dos hélices espiraladas) y se une a

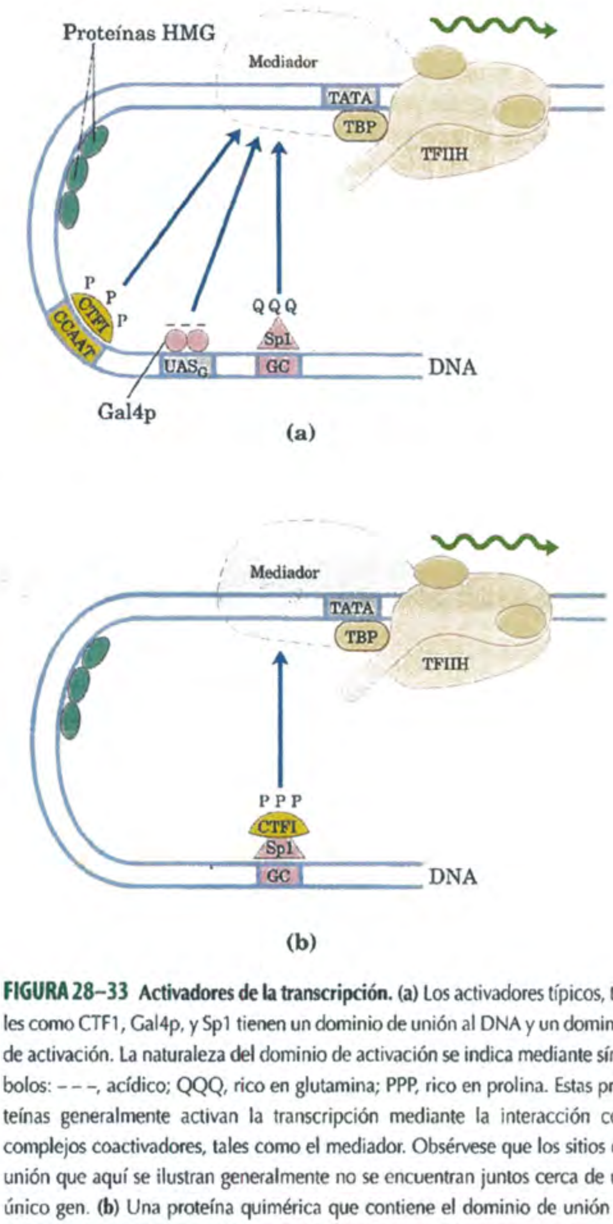


FIGURA 28–33 Activadores de la transcripción. **(a)** Los activadores típicos, tales como CTF1, Gal4p, y Sp1 tienen un dominio de unión al DNA y un dominio de activación. La naturaleza del dominio de activación se indica mediante símbolos: – – –, acídico; QQQ, rico en glutamina; PPP, rico en prolina. Estas proteínas generalmente activan la transcripción mediante la interacción con complejos coactivadores, tales como el mediador. Obsérvese que los sitios de unión que aquí se ilustran generalmente no se encuentran juntos cerca de un único gen. **(b)** Una proteína quimérica que contiene el dominio de unión al DNA de Sp1 y el dominio de activación de CTF1 activa la transcripción si una caja GC está presente.

UAS_G, una secuencia de DNA palindrómica de unos 17 pb de longitud. Gal4p tiene un domino de activación independiente con muchos residuos aminoácidos acídicos. Los experimentos en que el **dominio de activación acídico** de Gal4p se ha sustituido por una variedad de secuencias peptídicas sugieren que la naturaleza acídica de este domino es determinante para su función, a pesar de que su secuencia de aminoácidos concreta puede variar considerablemente.

Sp1 (M_r 80.000) es un activador de la transcripción de un gran número de genes en eucariotas superiores. Su sitio de unión al DNA, la caja o secuencia GC (secuencia consenso GGGCGG), se encuentra normalmente bastante cerca de la secuencia TATA. El dominio de unión al DNA de la proteína Sp1 está cerca del extremo carboxilo y contiene tres dedos de zinc. Otros dos dominios de Sp1 funcionan en la activación; es destacable que el 25% de sus residuos aminoácidos sean Gln. Una amplia variedad de otras proteínas activadoras poseen también estos **dominios ricos en glutamina.**

CTF1 (factor de transcripción 1 de unión a CCAAT) pertenece a una familia de activadores de la transcripción que se unen a una secuencia denominada sitio CCAAT (su secuencia consenso es $TGGN_6GCCAA$, donde N puede ser cualquier nucleótido). El dominio de unión al DNA de CTF1 contiene muchos residuos aminoácidos básicos y la región de unión está probablemente estructurada en hélice α. Esta proteína no tiene ni motivos hélice-giro-hélice ni dedos de zinc; su mecanismo de unión al DNA todavía no se ha aclarado. CTF1 tiene un **dominio de activación rico en prolina,** en el que Pro representa más del 20% de los residuos aminoácidos.

Los dominios de activación discretos y los de unión al DNA de las proteínas reguladoras a menudo actúan de forma completamente independiente, tal como se ha demostrado en experimentos de "intercambio de dominios". El dominio de activación rico en prolina de CTF1 puede fusionarse mediante técnicas de ingeniería genética (Capítulo 9) con el dominio de unión al DNA de Sp1 para crear una proteína que, al igual que el Sp1 intacto, se une a las secuencias GC del DNA y activa la transcripción de un promotor cercano (como en la Fig. 28–33b). El dominio de unión al DNA de Gal4p ha sido sustituido experimentalmente de forma similar con el dominio de unión al DNA del represor LexA de *E. coli* (de la respuesta SOS; Fig. 28–22). Esta proteína quimérica ni se une a UAS_G ni activa los genes *GAL* de la levadura (tal como haría la Gal4p intacta), a menos que la secuencia UAS_G en el DNA se sustituya por el sitio de reconocimiento de LexA.

La expresión génica eucariótica puede ser regulada por señales inter e intracelulares

Los efectos de las hormonas esteroideas (y de las hormonas tiroideas y retinoides, que comparten sus modos de acción) son ejemplos adicionales bien estudiados de la modulación de las proteínas reguladoras eucarióticas mediante la interacción directa con señales moleculares (véase la Fig. 12–29). A diferencia de otros tipos de hormonas, las hormonas de tipo esteroideo no se unen a receptores de la membrana plasmática. En cambio, interaccionan con receptores intracelulares que son en sí mismos activadores de la transcripción. Las hormonas esteroideas, demasiado hidrofóbicas para disolverse fácilmente en la sangre

TABLA 28–4 Elementos de respuesta hormonal (HRE) unidos por receptores hormonales de tipo esteroide

Receptor	Secuencia consenso unida*
Andrógeno	$GG(A/T)ACAN_2TGTTCT$
Glucocorticoide	$GGTACAN_3TGTTCT$
Ácido retinoico (algunos)	$AGGTCAN_5AGGTCA$
Vitamina D	$AGGTCAN_3AGGTCA$
Hormona tiroidea	$AGGTCAN_3AGGTCA$
RX†	AGGTCANAGGTCANAG GTCANAGGTCA

*N representa cualquier nucleótido.

†Forma un dímero con el receptor del ácido retinoico o con el receptor de la vitamina D.

(estrógenos, progesterona y cortisol, por ejemplo), viajan unidas a proteínas transportadoras específicas desde el punto de su liberación hasta sus tejidos diana. En el tejido diana, la hormona pasa a través de la membrana plasmática por simple difusión y se une a su proteína receptora específica en el núcleo. El complejo hormona-receptor actúa mediante la unión a secuencias de DNA muy específicas denominadas **elementos de respuesta hormonal (HRE),** alterando de este modo la expresión génica. La unión hormonal provoca cambios en la conformación de las proteínas receptoras de manera que son capaces de interaccionar con factores de transcripción adicionales. El complejo hormona-receptor unido puede tanto potenciar como suprimir la expresión de los genes adyacentes.

Las secuencias de DNA (HRE) a las que se unen los complejos hormona-receptor de las diversas hormonas esteroideas son similares en longitud y estructura, pero diferentes en secuencia. Cada receptor tiene una secuencia HRE consenso (Tabla 28–4) a la que el complejo hormona-receptor se une bien. Cada secuencia consenso consiste en dos secuencias de seis nucleótidos contiguas, o separadas por tres nucleótidos, dispuestas en tándem o en palíndromo. Los receptores hormonales tienen un dominio de unión al DNA altamente conservado con dos dedos de zinc **(Fig. 28–34)**. El complejo hormona-receptor se une al DNA como un dímero, y los dominios con dedos de zinc de cada monómero reconocen las secuencias de seis nucleótidos. La capacidad de una hormona para alterar la expresión de un gen específico a través del complejo hormona-receptor depende de la secuencia exacta del HRE, su posición relativa respecto al gen y el número de HRE asociados con el gen.

A diferencia del dominio de unión al DNA, la región de unión al ligando de la proteína receptora, siempre en el extremo carboxilo, es bastante específica de cada receptor. En la región de unión al ligando, el receptor de los glucocorticoides tiene una similitud de sólo el 30% con el receptor de los estrógenos y del 17% con el receptor de la hormona tiroidea. El tamaño de la región de unión al ligando varía enormemente; en el receptor de la vitamina D sólo tiene 25 residuos aminoácidos, mientras que en el receptor de los mineralocorticoides tiene 603 residuos. Las mutaciones que cambian un aminoácido en estas regiones pueden causar la pérdida de respuesta a una hormona determinada. Algunos humanos, incapaces de responder al cortisol, a la tes-

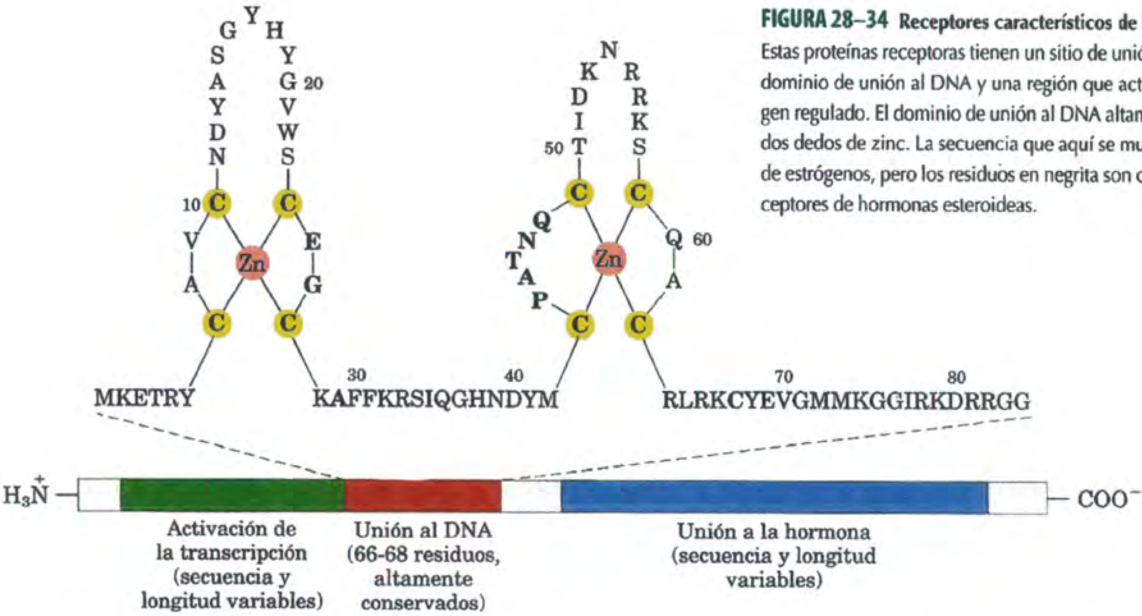


FIGURA 28–34 Receptores característicos de hormonas esteroideas. Estas proteínas receptoras tienen un sitio de unión para la hormona, un dominio de unión al DNA y una región que activa la transcripción del gen regulado. El dominio de unión al DNA altamente conservado tiene dos dedos de zinc. La secuencia que aquí se muestra es la del receptor de estrógenos, pero los residuos en negrita son comunes a todos los receptores de hormonas esteroideas.

tosterona, a la vitamina D o a la tiroxina, tienen mutaciones de este tipo.

Algunos receptores hormonales, incluido el receptor de la progesterona en humanos, activan la transcripción con ayuda de un coactivador inusual, el **RNA activador del receptor de los esteroides (SRA),** un RNA de ~700 nucleótidos. El SRA actúa como una parte de un complejo ribonucleoproteico, pero es el componente de RNA el responsable de la coactivación de la transcripción. El conjunto detallado de interacciones entre el SRA y otros componentes de los sistemas reguladores de estos genes está todavía por descubrir.

La fosforilación de los factores de transcripción nucleares puede contribuir a su regulación

Vimos en el Capítulo 12 que los efectos de la insulina sobre la expresión génica están mediados por unos pasos que desembocan en la activación de una proteína quinasa en el núcleo, que fosforila proteínas de unión al DNA específicas, cuya capacidad para actuar como factores de transcripción resulta modificada (véase la Fig. 12–15). Este mecanismo general es el responsable de los efectos de muchas hormonas no esteroideas. Así, la vía β-adrenérgica, que produce niveles altos de cAMP citosólico, el cual actúa como un segundo mensajero en eucariotas y en bacterias (véanse las Figs. 12–4 y 28–18), también afecta la transcripción de una serie de genes, cada uno de los cuales se encuentra cerca de una secuencia específica de DNA denominada **elemento de respuesta al cAMP (CRE).** La subunidad catalítica de la proteína quinasa A, liberada al aumentar los niveles de cAMP (véase la Fig. 12–16), entra en el núcleo y fosforila una proteína nuclear, la **proteína de unión al CRE (CREB).** Una vez fosforilada, la CREB se une a los CRE cerca de determinados genes y actúa como un factor de transcripción, activando la expresión de esos genes.

Muchos mRNA eucarióticos están sometidos a represión traduccional

La regulación a nivel de traducción supone un papel mucho más destacado en los eucariotas que en las bacterias y se observa en una variedad de situaciones celulares. En contraste con el estrecho acoplamiento entre la transcripción y la traducción en las bacterias, los transcritos generados en un núcleo eucariótico tienen que ser modificados y transportados hacia el citoplasma antes de la traducción. Ello puede implicar un retraso significativo en la aparición de una proteína. Cuando se requiere un incremento rápido de la producción de una proteína, un mRNA reprimido traduccionalmente presente en el citoplasma puede ser activado para que sea traducido sin retraso. La regulación de la traducción puede desempeñar un papel especialmente importante en la regulación de ciertos genes eucarióticos muy largos (algunos se miden en millones de pares de bases), para los que la transcripción y la maduración del mRNA puede requerir muchas horas. Algunos genes se regulan tanto en las etapas de transcripción como de traducción, estando implicada esta última en el ajuste preciso de los niveles de proteínas celulares. En algunas células anucleadas, tales como los reticulocitos (eritrocitos inmaduros), el control de la transcripción es totalmente inasequible y el control de la traducción de los mRNA almacenados se convierte en esencial. Tal como se describe seguidamente, los controles de la traducción pueden tener también un significado espacial durante el desarrollo, donde la traducción regulada de mRNA preposicionados crea un gradiente local del producto proteico.

Los eucariotas tienen al menos cuatro mecanismos principales de regulación de la traducción:

1. Los factores de inicio de la traducción están sujetos a fosforilación por proteína quinasas. Las formas fosforiladas son a menudo menos activas y causan una depresión general de la traducción en la célula.
2. Algunas proteínas se unen directamente al mRNA y actúan como represores de la traducción y muchas se unen a sitios específicos de la región 39 no traducida (39UTR). Una vez posicionadas, interaccionan con otros factores de inicio de la traducción unidos al mRNA o con la subunidad ribosómica 40S para impedir el inicio de la traducción (**Fig. 28–35**; compárese con la Fig. 27–27).

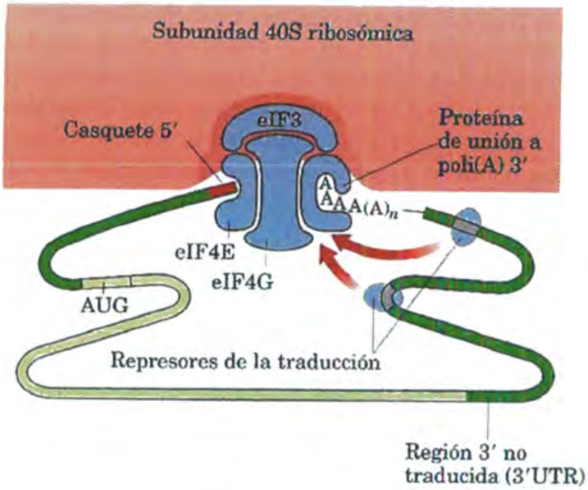


FIGURA 28–35 Regulación de la traducción de mRNA eucarióticos. Uno de los mecanismos más importantes de regulación de la traducción en los eucariotas se basa en la unión de represores de la traducción (proteínas de unión al RNA) a sitios específicos de la región 3′ no traducida (3′UTR) del mRNA. Estas proteínas interaccionan con factores de inicio eucarióticos o con el ribosoma (véase la Fig. 27–27) para impedir o disminuir la traducción.

3. Proteínas de unión, presentes en los eucariotas desde las levaduras hasta los mamíferos, impiden la interacción entre eIF4E y eIF4G (véase la Fig. 27–27). Las proteínas de los mamíferos se denominan 4E–BP (proteínas de unión eIF4E). Cuando el crecimiento celular es lento, estas proteínas limitan la traducción uniéndose al sitio de eIF4E que normalmente interacciona con eIF4G. Cuando se reanuda o aumenta el crecimiento celular en respuesta a factores de crecimiento u otros estímulos, las proteínas de unión se inactivan mediante fosforilación dependiente de proteína quinasas.
4. La regulación de la expresión génica dirigida por RNA, examinada más adelante, a menudo se produce a nivel de la represión de la traducción.

La variedad de mecanismos de regulación de la traducción proporciona una gran flexibilidad y permite la represión de sólo algunos mRNA o la regulación global de toda la traducción celular.

La regulación de la traducción ha sido especialmente bien estudiada en los reticulocitos. Uno de los mecanismos presentes en estas células utiliza el eIF2, el factor de inicio que se une al tRNA iniciador, y lo transporta hacia el ribosoma; cuando el Met-tRNA se ha unido al sitio P, el factor eIF2B se une a eIF2, reciclándolo con la ayuda de la unión y la hidrólisis de GTP. La maduración de los reticulocitos implica la destrucción del núcleo celular, que deja atrás una membrana plasmática llena de hemoglobina. Los RNA mensajeros presentes en el citoplasma antes de la pérdida del núcleo permiten la reposición de la hemoglobina. Cuando los reticulocitos se vuelven deficientes en hierro o en hemo, la traducción de los mRNA de la globina se reprime. Una proteína quinasa, denominada **HCR (represor controlado por hemina),** se activa, catalizando la fosforilación de eIF2. En su forma fosforilada, eIF2 forma un complejo estable con eIF2B que secuestra eIF2, impidiendo que esté disponible para participar en la traducción. De esta manera, el reticulocito coordina la síntesis de globina de acuerdo con la disponibilidad de hemo.

Se han encontrado numerosos ejemplos adicionales de regulación de la traducción en estudios del desarrollo de organismos multicelulares, tema que trataremos con mayor detalle a continuación.

El silenciamiento postranscripción de los genes se produce por interferencia del RNA

En los eucariotas superiores, incluidos los nemátodos, las moscas del vinagre, las plantas y los mamíferos, se ha descubierto una clase de pequeños RNA, denominados **micro-RNA (miRNA),** que participa en el silenciamiento de muchos genes. Estos RNA actúan interaccionando con el mRNA, a menudo en el 3′UTR, provocando su degradación o la inhibición de la traducción. En ambos casos, el mRNA, y por tanto el gen que lo produce, es silenciado. Esta forma de regulación génica controla el desarrollo temporal en al menos algunos organismos. También se utiliza como un mecanismo de protección frente a virus RNA invasores (de especial importancia en las plantas que carecen de sistema inmune) y para controlar la actividad de los transposones. Además, estas pequeñas moléculas de RNA juegan un papel fundamental (pero todavía por definir) en la formación de la heterocromatina.

Muchos miRNA están presentes solamente de manera transitoria durante el desarrollo, y a veces se denominan **pequeños RNA temporales (stRNA).** En los eucariotas superiores se han identificado millares de miRNA diferentes, que pueden influir en la regulación de un tercio de los genes de los mamíferos. Se transcriben en forma de un RNA precursor de unos 70 nucleótidos, con secuencias complementarias internas que forman estructuras en horquilla (véase la Fig. 26–28). Los precursores se cortan con endonucleasas como Drosha y Dicer para formar dúplex cortos de 20 a 25 nucleótidos de longitud. Una de las hebras del miRNA maduro se asocia con el mRNA diana (o con el RNA de un virus o de un transposón), provocando la inhibición de la traducción o la degradación del RNA **(Fig. 28–36)**. Algunos miRNA se unen y afectan un único mRNA, con lo que así influyen en la expresión de un solo gen. Otros interaccionan con múltiples mRNA y, por tanto, constituyen el núcleo del mecanismo de los regulones que coordinan la expresión de una multiplicidad de genes.

Este mecanismo de regulación génica tiene un aspecto interesante y práctico que lo hace sumamente útil. Si se introduce en un organismo una molécula de RNA dúplex, correspondiente a la secuencia de prácticamente cualquier mRNA, la endonucleasa Dicer corta el dúplex en cortos fragmentos denominados **pequeños RNA de interferencia (siRNA).** Estos fragmentos se unen al mRNA y lo silencian. (Fig. 28–36b). El proceso se conoce como **interferencia por RNA (iRNA)**. En las plantas, prácticamente cualquier gen puede ser silenciado de esta manera. Los nemátodos ingieren fácilmente RNA enteros y funcionales, por lo que la simple introducción del RNA dúplex en la dieta de los gusanos produce la supresión efectiva del gen diana.

Esta técnica se ha convertido rápidamente en una herramienta muy eficaz para estudiar la función génica, porque

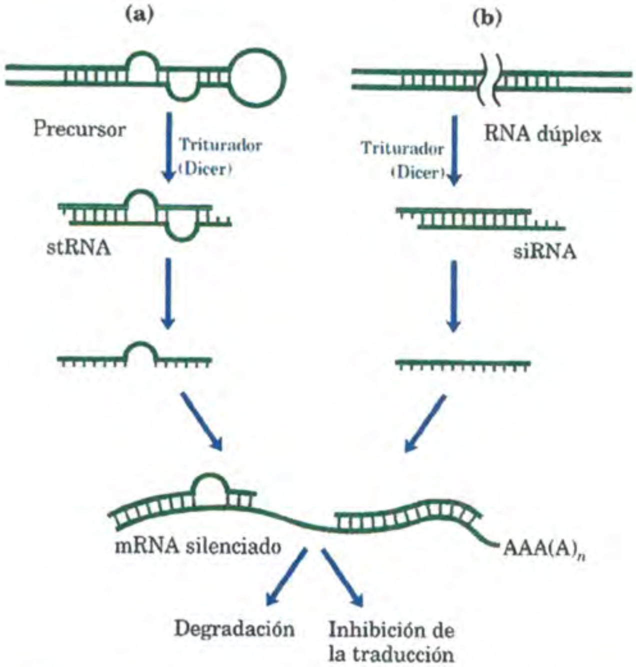


FIGURA 28–36 Silenciamiento de genes por RNA de interferencia. (a) El corte de largos precursores plegados sobre sí mismos para formar regiones de doble cadena por un enzima triturador (Dicer) genera pequeños RNA transitorios (stRNA). Los stRNA se unen a los mRNA, provocando la degradación del mRNA o la inhibición de la traducción. **(b)** Se pueden construir RNA de doble cadena para introducirlos en las células. El triturador corta los dúplex de RNA en pequeños RNA (siRNA) de interferencia, que interaccionan con el mRNA diana. El mRNA es a su vez degradado o su traducción inhibida.

puede suprimirla sin necesidad de crear un organismo mutante. Este procedimiento también se puede aplicar en humanos. Se han usado siRNA sintetizados en el laboratorio para bloquear el VIH y las infecciones por polivirus en células humanas en cultivo durante una semana aproximadamente. Los rápidos progresos de los estudios sobre el RNA de interferencia aconsejan tenerlos en cuenta de cara a futuros avances médicos.

La regulación de la expresión génica mediada por RNA adopta múltiples formas en los eucariotas

Los RNA de función especializada de los eucariotas incluyen los miRNA descritos anteriormente; los snRNA, implicados en el corte y empalme del RNA (véase la Fig. 26–16), y los snoRNA, implicados en la modificación del rRNA (véase la Fig. 26–26). Todos los RNA que no codifican proteínas, incluidos los rRNA y los tRNA, se designan genéricamente como **ncRNA** (RNA no codificantes). Los genomas de los mamíferos parecen codificar más ncRNA que mRNA codificantes (véase el Recuadro 26–4). No es, pues, sorprendente que continúen descubriéndose nuevas clases de ncRNA.

Muchos de los ejemplos recién descubiertos interaccionan con proteínas, en lugar de con RNA, y afectan la función de las proteínas unidas. El SRA, que actúa de coactivador de los genes de respuesta a hormonas esteroideas, es un ejemplo: afecta la activación de la transcripción. La respuesta al choque térmico en células humanas es otro ejemplo. El factor 1 del choque térmico (HFS-1) es una proteína activadora que en células no estresadas se encuentra como un monómero unido a la chaperona Hsp90. En condiciones de estrés, el HSF-1 se disocia de la Hsp90 y trimeriza. El trímero de HSF-1 se une al DNA y activa la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para afrontar el estrés. Un ncRNA, denominado HSR1 (RNA 1 del choque térmico; ~600 nucleótidos) estimula la trimerización de HSF1 y la unión al DNA. El HSR1 no actúa solo; funciona como un complejo con el factor de elongación eEF1A.

Otros RNA afectan la transcripción de diversas maneras. Además de su papel en el corte y empalme (véase la Fig. 26–17), el snRNA U1 se une directamente al factor de transcripción TFIIH. Su función en este contexto todavía no está clara, pero podría regular TFIIH o afectar el acoplamiento entre transcripción y corte y empalme o ambos procesos. Un ncRNA de 331 nucleótidos, denominado 7SK, abundante en los mamíferos, se une al factor de elongación de la transcripción p-TEFb (véase la Tabla 26–2) de Pol II y reprime la elongación del transcrito. Otro ncRNA, B2 (~178 nucleótidos), se une directamente a Pol II durante el choque térmico y reprime la transcripción. Pol II unida a B2 forma PIC estables, pero la transcripción está bloqueada. El RNA B2 bloquea, así, la transcripción de muchos genes durante el choque térmico. El mecanismo que permite la expresión de los genes que responden a HSF-1 en presencia de B2 es todavía desconocido.

Los papeles conocidos de los ncRNA en la expresión génica y otros procesos celulares siguen expandiéndose rápidamente. Al mismo tiempo, el estudio de la bioquímica de la regulación génica está menos centrado en torno de las proteínas.

El desarrollo está controlado por cascadas de proteínas reguladoras

Por su gran complejidad y complicada coordinación, los patrones de regulación génica que rigen el desarrollo desde el zigoto hasta un animal o planta multicelular no tienen parangón. El desarrollo requiere transiciones de morfología y de composición proteica que dependen de cambios estrechamente coordinados en la expresión del genoma.

Se expresan más genes durante el desarrollo temprano que en ningún otro momento del ciclo vital. Así por ejemplo, el oocito del erizo de mar tiene alrededor de 18.500 mRNA *diferentes*, comparado con los aproximadamente 6.000 mRNA diferentes de las células de un tejido diferenciado típico. Los mRNA del oocito dan lugar a una cascada de sucesos que regulan la expresión de muchos genes tanto en el espacio como en el tiempo.

Varios organismos se han convertido en importantes sistemas modelo para el estudio del desarrollo, ya que son fáciles de mantener en el laboratorio y tienen un tiempo de generación relativamente corto. Entre ellos se encuentran los nemátodos, las moscas del vinagre, el pez cebra, los ratones y la planta *Arabidopsis*. Esta discusión se centra en el desarrollo de las moscas del vinagre. Nuestra comprensión de los procesos moleculares durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* es especialmente detallada y puede ser útil para ilustrar patrones y principios del significado general.

El ciclo vital de la mosca del vinagre incluye la metamorfosis completa durante su progresión desde el embrión hasta el

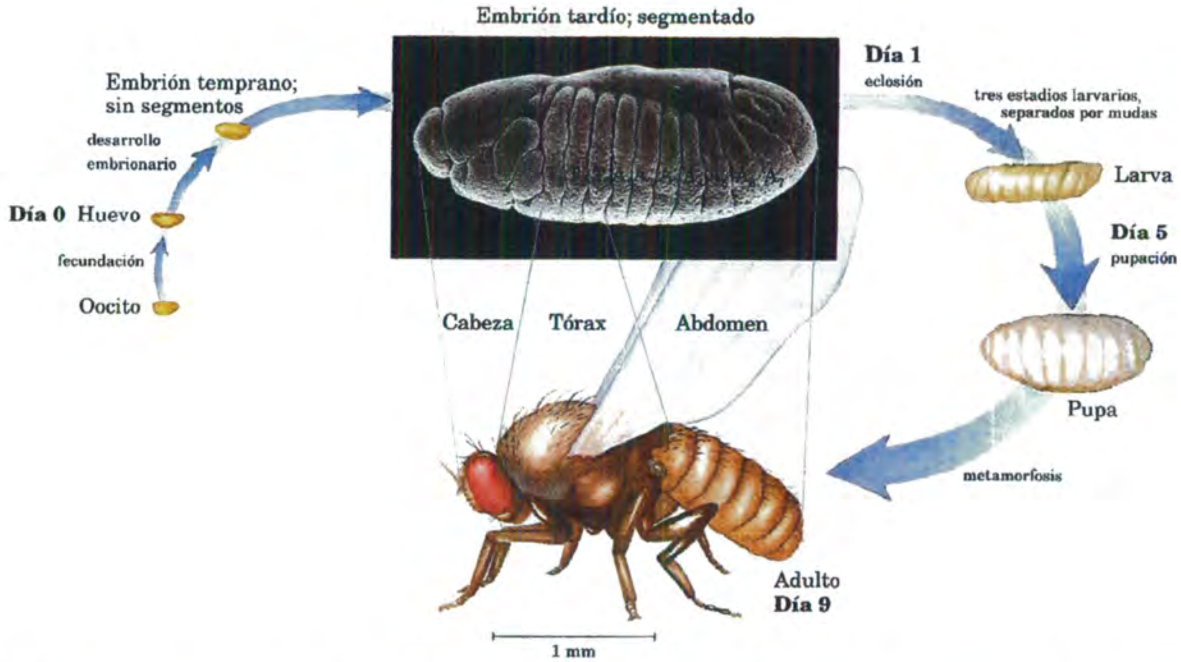


FIGURA 28–37 Ciclo vital de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* sufre una metamorfosis completa, lo que significa que el insecto adulto es radicalmente diferente, en forma de sus estadios inmaduros, una transformación que requiere extensas alteraciones durante el desarrollo. Hacia el estadio embrionario tardío, los segmentos se han formado, cada uno contiene estructuras especializadas a partir de las cuales se desarrollarán varios apéndices y otras características en la mosca adulta.

adulto (**Fig. 28–37**). Entre las características más importantes del embrión están la **polaridad** (las partes anterior y posterior del animal son fácilmente distinguibles, al igual que sus partes dorsal y ventral) y el **metamerismo** (el cuerpo del embrión está compuesto por una serie de segmentos repetidos, cada uno con propiedades características).

Durante el desarrollo, estos segmentos se organizan en cabeza, tórax y abdomen. Cada segmento del tórax del adulto tiene un par de apéndices diferentes. El desarrollo de este complejo patrón se encuentra bajo control genético, y se han descubierto diversos genes reguladores del patrón que afectan profundamente la organización del cuerpo.

El huevo de *Drosophila*, junto con 15 células nodriza, está rodeado por una capa de células foliculares (**Fig. 28–38**). A medida que se forma la célula huevo (antes de la fecundación), los mRNA y proteínas que se originan en las células nodriza y foliculares se depositan en la célula huevo, donde desempeñan un papel determinante en el desarrollo. Una vez puesto el huevo fertilizado, su núcleo se divide y sus descendientes nucleares continúan dividiéndose sincrónicamente cada 6 a 10 min. Las membranas plasmáticas no se forman alrededor de estos núcleos que se distribuyen dentro del citoplasma del huevo (formando un sincitio). Al cabo de ocho a once ciclos de división nuclear, los núcleos migran hacia la capa externa del huevo, formando una monocapa de núcleos que rodea el citoplasma común rico en yema; éste es el blastodermo sincitial. Después de algunas divisiones adicionales, invaginaciones de la membrana envuelven los núcleos para crear una capa de células que forman el blastodermo celular. En este estadio, los ciclos mitóticos de las células pierden su sincronía. El destino de las células en el desarrollo viene determinado por los mRNA y las proteínas depositados originalmente en el huevo por las células nodriza y foliculares.

Las proteínas que mediante cambios de la concentración o actividad locales provocan que el tejido circundante adopte una forma o estructura particular a veces se denominan **morfógenos;** son los productos de los genes reguladores del patrón. Tal como definieron Christiane Nüsslein-Volhard, Edward B. Lewis y Eric F. Wieschaus, tres clases principales de genes que regulan el patrón —maternos, de segmentación y homeóticos— actúan en estadios sucesivos del desarrollo para especificar las características básicas del cuerpo embrionario de *Drosophila*. Los **genes maternos** se expresan en el huevo no fecundado y los **mRNA maternos** resultantes permanecen latentes hasta la fecundación. Éstos proporcionan la mayoría de las proteínas necesarias en el desarrollo más temprano, hasta que se forma el blastodermo celular. Algunas de las proteínas codificadas por los mRNA maternos dirigen la organización espacial del embrión en desarrollo en estadios tempranos, estableciendo así su polaridad. Los **genes de segmentación** se transcriben después de la fecundación y dirigen la formación del número correcto de segmentos corporales. Al menos tres subclases de genes de segmentación actúan en etapas sucesivas: los **genes gap** dividen el embrión en desarrollo en varias regiones amplias y los **genes de la regla par** junto con los **genes de la polaridad de los segmentos** definen las 14 bandas que se convierten en los 14 segmentos de un embrión normal. Los **genes homeóticos** se expresan todavía más tarde; especifican qué órganos y apéndices se desarrollarán en los distintos segmentos corporales.

Los numerosos genes reguladores en estas tres clases dirigen el desarrollo de una mosca adulta con una cabeza, un tórax y un abdomen, con el número adecuado de segmentos y con los

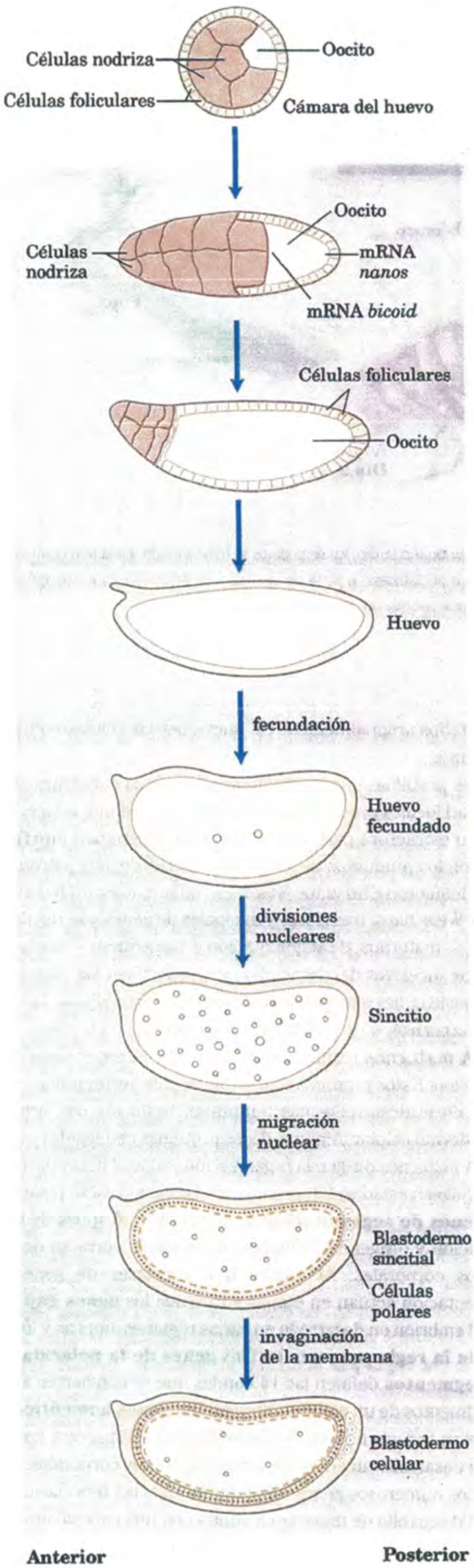


FIGURA 28–38 Desarrollo temprano en *Drosophila*. Durante el desarrollo del huevo se depositan mRNA maternos (incluidos los transcritos de los genes *bicoid* y *nanos*, que se tratan en el texto) y proteínas en el oocito en desarrollo (célula huevo no fecundada) por mediación de células nodriza y células foliculares. Después de la fecundación, los dos núcleos del huevo fecundado se dividen sincrónicamente en el citoplasma común (sincitio) y a continuación emigran hacia la periferia. Invaginaciones de la membrana rodean los núcleos para formar una monocapa de células en la periferia; ésta es la fase de blastodermo celular. Durante las divisiones nucleares tempranas, varios núcleos en el extremo más posterior se convierten en células polares, las cuales se transforman más tarde en células de la línea germinal.

apéndices correctos en cada segmento. Aunque la embriogénesis tarda cerca de un día en completarse, todos estos genes se activan durante las primeras cuatro horas. Algunos mRNA y proteínas están presentes sólo durante unos pocos minutos en puntos específicos durante este período. Algunos de los genes codifican factores de transcripción que afectan la expresión de otros genes en una especie de cascada de desarrollo. También se da la regulación a nivel de la traducción y muchos de los genes reguladores codifican represores de la traducción, la mayoría de los cuales se unen al 3′UTR del mRNA (Fig. 28–35). Debido a que muchos mRNA se depositan en el huevo mucho antes de que se requiera su traducción, la represión de la traducción constituye una vía especialmente importante para la regulación de las rutas del desarrollo.

Genes maternos Algunos genes maternos se expresan en las células nodriza y foliculares y algunos en el propio huevo. En el huevo de *Drosophila* no fecundado, los productos génicos maternos establecen dos ejes: el antero-posterior y el dorso-ventral, y por tanto definen qué regiones del huevo radialmente simétrico se desarrollarán para dar la cabeza y el abdomen, así como la parte dorsal y ventral de la mosca adulta. Un hecho clave en el desarrollo más temprano es el establecimiento de gradientes de mRNA y proteínas a lo largo de los ejes corporales. Algunos mRNA maternos tienen productos proteicos que difunden a través del citoplasma para crear una distribución asimétrica en el huevo. Diferentes células en el blastodermo celular reciben, por tanto, diferentes cantidades de estas proteínas, que sitúan las células en diferentes vías del desarrollo. Los productos de los mRNA maternos incluyen activadores o represores de la transcripción, así como represores de la traducción; todos ellos regulan la expresión de otros genes reguladores del patrón.

Los patrones específicos resultantes y las secuencias de expresión génica difieren, por tanto, en las distintas líneas celulares, que en último término dirigen el desarrollo de cada estructura adulta.

El eje antero-posterior de *Drosophila* se define al menos en parte por los productos de los genes *bicoid* y *nanos*. El producto del gen *bicoid* es un importante morfógeno anterior y el producto génico de *nanos* es un importante morfógeno posterior. El mRNA del gen *bicoid* es sintetizado por las células nodriza y depositado en el huevo no fecundado cerca del polo

Christiane Nüsslein-Volhard

anterior. Nüsslein-Volhard descubrió que este mRNA se traduce poco después de la fecundación y que la proteína Bicoid difunde a través de la célula para crear, hacia la séptima división nuclear, un gradiente de concentración que irradia desde el polo anterior **(Fig. 28–39a)**. La proteína Bicoid es un factor de transcripción que activa la expresión de diversos genes de segmentación; la proteína contiene un homeodomino (p. 1124). Bicoid es también un represor de la traducción que inactiva ciertos mRNA. Las cantidades de proteína Bicoid en varias partes del embrión afectan la expresión ulterior de otros genes de manera dependiente de umbral. Los genes se activan transcripcionalmente o se reprimen traduccionalmente sólo cuando la concentración de proteína Bicoid excede el umbral. Los cambios en la forma del gradiente de concentración de Bicoid tienen efectos espectaculares sobre el patrón corporal. La falta de proteína Bicoid provoca el desarrollo de un embrión con dos abdómenes, pero sin cabeza ni tórax (Fig. 28–39b); no obstante, embriones sin Bicoid se desarrollan de manera normal si se inyecta una cantidad adecuada de mRNA *bicoid* en el extremo apropiado del huevo. El gen *nanos* tiene un papel análogo, pero su mRNA se deposita en el extremo posterior del huevo y el gradiente proteico antero-posterior llega a su punto más alto en el polo posterior. La proteína Nanos es un represor de la traducción.

Una visión más amplia de los efectos de los genes maternos revela los aspectos fundamentales de un circuito del desarrollo. Además de los mRNA *bicoid* y *nanos*, que se depositan en el huevo de forma asimétrica, otros mRNA maternos se depositan uniformemente en todo el citoplasma del huevo. Tres de estos mRNA codifican las proteínas Pumilio, Hunchback y Caudal, todas ellas afectadas por *nanos* y *bicoid* **(Fig. 28–40)**. Caudal y Pumilio están implicadas en el desarrollo del extremo posterior de la mosca. Caudal es un activador de la transcripción con un homeodominio; Pumilio es un represor de la traducción. La

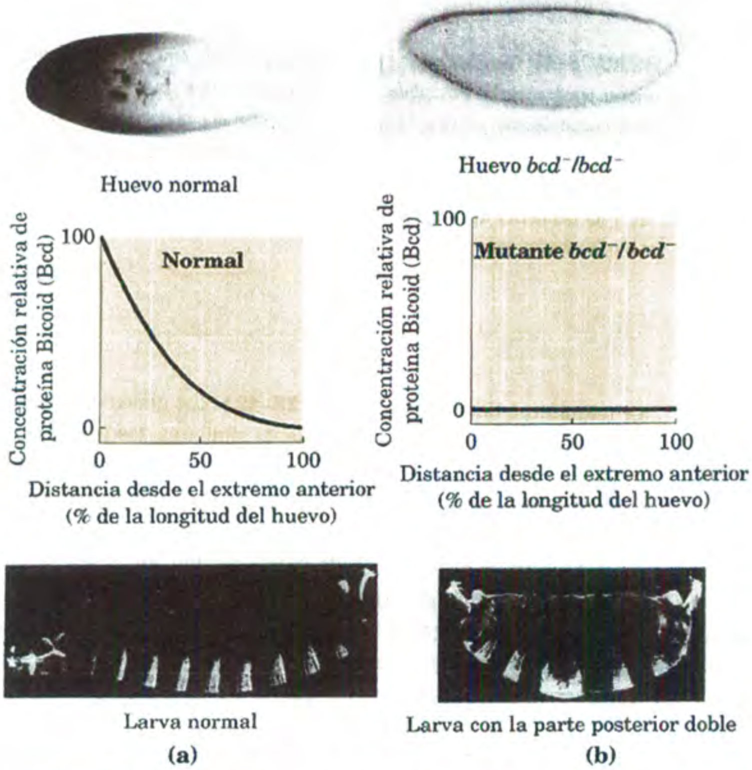


FIGURA 28–39 Distribución de un producto génico materno en un huevo de *Drosophila*. **(a)** Micrografía de un huevo teñido inmunológicamente, que muestra la distribución del producto génico *bicoid* (*bcd*). La gráfica mide la intensidad de la tinción. Esta distribución es esencial para el desarrollo normal de las estructuras anteriores del animal. **(b)** Si el gen *bcd* no se expresa en la madre (mutante bcd^-/bcd^-) y, por lo tanto, no se deposita en el huevo mRNA *bicoid*, el embrión resultante tiene dos partes posteriores (y muere pronto).

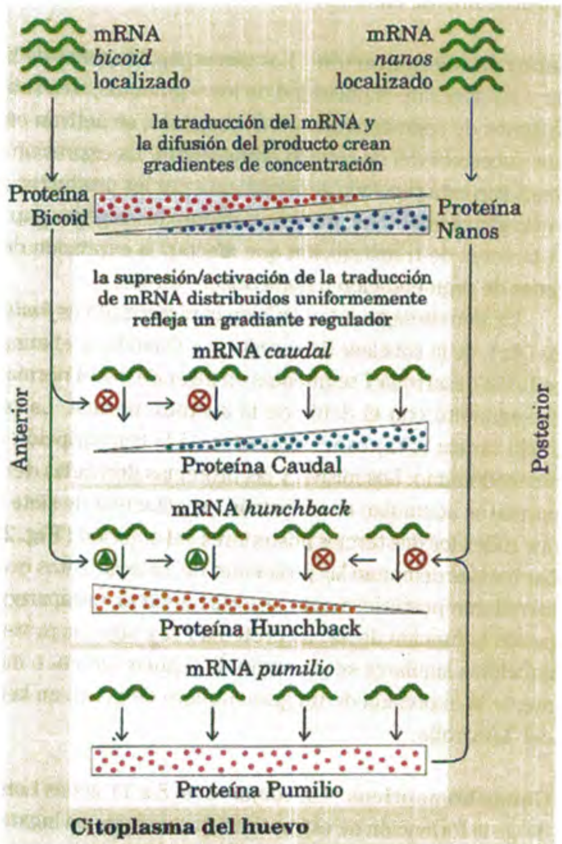


FIGURA 28–40 Circuitos reguladores del eje antero-posterior en un huevo de *Drosophila*. Los mRNA *bicoid* y *nanos* se localizan cerca de los polos anterior y posterior, respectivamente. Los mRNA *caudal*, *hunchback* y *pumilio* se distribuyen por todo el citoplasma del huevo. Los gradientes de proteínas Bicoid (Bcd) y Nanos dan lugar a la acumulación de proteína Hunchback en la parte anterior y de proteína Caudal en la parte posterior del huevo. Debido a que la proteína Pumilio requiere la proteína Nanos para su actividad como represor de la traducción de *hunchback*, sólo actúa en el extremo posterior.

proteína Hunchback desempeña un papel importante en el desarrollo de la parte anterior de la mosca y también es un regulador de la transcripción de varios genes, siendo en algunos casos un regulador positivo, mientras que en otros casos es negativo. Bicoid suprime la traducción de *caudal* en el extremo anterior y también actúa como un activador de la transcripción de *hunchback* en el blastodermo celular. Debido a que *hunchback* se expresa tanto a partir de mRNA maternos como de genes del huevo en desarrollo, se considera tanto un gen materno como un gen de segmentación. El resultado de las actividades de Bicoid es un incremento de la concentración de Hunchback en el extremo anterior del huevo. Las proteínas Nanos y Pumilio actúan como represores de la traducción de *hunchback*, suprimiendo la síntesis de su proteína cerca del extremo posterior del huevo. Pumilio no funciona en ausencia de la proteína Nanos y el gradiente de la expresión de Nanos limita la actividad de ambas proteínas a la región posterior.

La represión de la traducción del gen *hunchback* provoca la degradación del mRNA de *hunchback* cerca del extremo posterior. Sin embargo, la deficiencia de proteína Bicoid en la parte posterior promueve la expresión de *caudal*. De esta manera, las proteínas Hunchback y Caudal acaban distribuidas asimétricamente en el huevo.

Genes de segmentación Los genes gap, los genes de la regla par y los genes de la polaridad de los segmentos, tres subclases de genes de segmentación en *Drosophila*, se activan en estadios sucesivos del desarrollo embrionario. La expresión de los genes gap está regulada generalmente por los productos de uno o más genes maternos. Al menos alguno de los genes gap codifica factores de transcripción que afectan la expresión de otros genes de segmentación u homeóticos (tardíos).

Un gen de segmentación bien caracterizado es *fushi tarazu* (*ftz*), de la subclase de la regla par. Cuando se elimina *ftz*, el embrión desarrolla 7 segmentos en lugar de los 14 normales, cada segmento con el doble de la anchura normal. La proteína Fushi-tarazu (Ftz) es un activador de la transcripción con un homeodominio. Los mRNA y las proteínas derivadas del gen *ftz* normal se acumulan en un patrón espectacular de siete bandas que rodea los dos tercios posteriores del embrión (**Fig. 28–41**). Las bandas delimitan las posiciones de los segmentos que se desarrollarán posteriormente; estos segmentos desaparecen si se pierde la función de *ftz*. La proteína Ftz y algunas proteínas reguladoras similares se encargan de regular directa o indirectamente la expresión de un gran número de genes en la cascada del desarrollo.

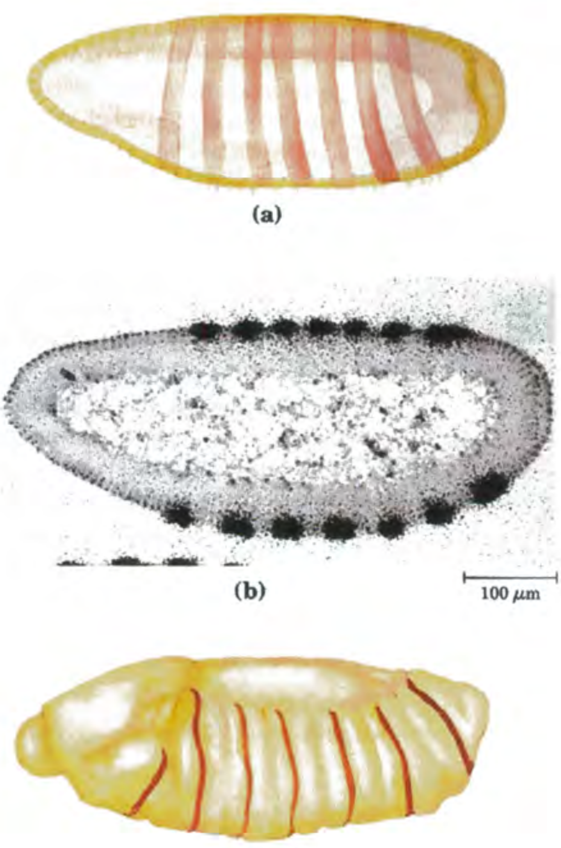


FIGURA 28–41 Distribución del producto del gen *fushi tarazu (ftz)* en embriones tempranos de *Drosophila*. (a) En el embrión normal, el producto génico se puede detectar en siete bandas que circundan al embrión (se muestran esquemáticamente). Estas bandas (b) aparecen como manchas oscuras (generadas por una marca radiactiva) en una autorradiografía de una sección transversal, y (c) demarcan los márgenes anteriores de los segmentos en el embrión tardío (marcados en rojo).

Genes homeóticos Un conjunto de 8 a 11 genes homeóticos dirige la formación de estructuras particulares en lugares determinados del organismo. Estos genes se denominan comúnmente **genes *Hox*,** término derivado de "homeosecuencia", la secuencia génica conservada que codifica el homeodominio y que está presente en todos estos genes. A pesar de su denominación, estos no son las únicas proteínas relacionadas con el desarrollo que contienen un homeodominio (por ejemplo, el producto del gen *bicoid*, descrito anteriormente contiene un homeodominio), y "Hox" es más una clasificación funcional que estructural. Los genes *Hox* están organizados en agrupamientos genómicos. *Drosophila* tiene un agrupamiento de este tipo y los mamíferos tienen cuatro (**Fig. 28–42**). Los genes de estos agrupamientos son sorprendentemente similares desde los nemátodos a los humanos. En *Drosophila*, cada uno de los genes *Hox* se expresa en un segmento particular del embrión y controla el desarrollo de la parte correspondiente de la mosca madura. La nomenclatura utilizada para describir los genes *Hox* puede resultar confusa. Tienen nombres históricos en el caso de la mosca del vinagre (por ejemplo, *ultrabithorax*), mientras que en los mamíferos coexisten dos sistemas para designar los agrupamientos, basados en letras (A, B, C, D) o en números (1, 2, 3, 4).

La pérdida de genes *Hox* por mutación o deleción causa la aparición de un apéndice o estructura corporal normal en una posición corporal inapropiada. Un ejemplo importante es el gen *ultrabithorax* (*ubx*). Cuando se pierde la función de Ubx, el primer segmento abdominal se desarrolla incorrectamente, adoptando la estructura del tercer segmento torácico. Otras mutaciones homeóticas conocidas causan la formación de un par de alas extra o dos patas en la posición de la cabeza donde

normalmente se encuentran las antenas **(Fig. 28–43)**. Los genes *Hox* a menudo se extienden a través de largas regiones del DNA. El gen *ubx*, por ejemplo, tiene una longitud de 77.000 pb. Más de 73.000 pb de este gen son intrones, uno de los cuales tiene más de 50.000 pb de longitud. La transcripción del gen *ubx* tarda cerca de una hora. Se cree que esta demora en la expresión del gen *ubx* es un mecanismo temporizador implicado en la regulación temporal de ulteriores fases del desarrollo. Muchos genes *Hox* son regulados además por miRNA codificados en las regiones intergénicas de los agrupamientos de los genes *Hox*. Todos los productos de los genes *Hox* son factores de transcripción que regulan ulteriormente la expresión de conjuntos de genes corriente abajo. La identificación de estos genes es objeto de estudio.

Muchos de los principios del desarrollo descritos anteriormente son aplicables a otros eucariotas, desde los nemátodos hasta los humanos. Algunas de las proteínas reguladoras están conservadas. Por ejemplo, los productos de los genes con homeosecuencias *HOXA7* en el ratón y *antennapedia* en la mosca del vinagre difieren en un solo residuo aminoácido. Por supuesto, a pesar de que los mecanismos de regulación molecular pueden ser similares, muchos de los aspectos del desarrollo final no están conservados (los humanos no tienen ni alas ni antenas).

El resultado final está determinado por las diferencias en los genes diana controlados por los genes *Hox*. El descubrimiento de determinantes estructurales con funciones moleculares identificables es el primer paso en la comprensión de los procesos moleculares subyacentes del desarrollo. A medida que se vayan descubriendo más genes y sus productos proteicos, las características bioquímicas de este inmenso rompecabezas se conocerán cada vez con mayor detalle.

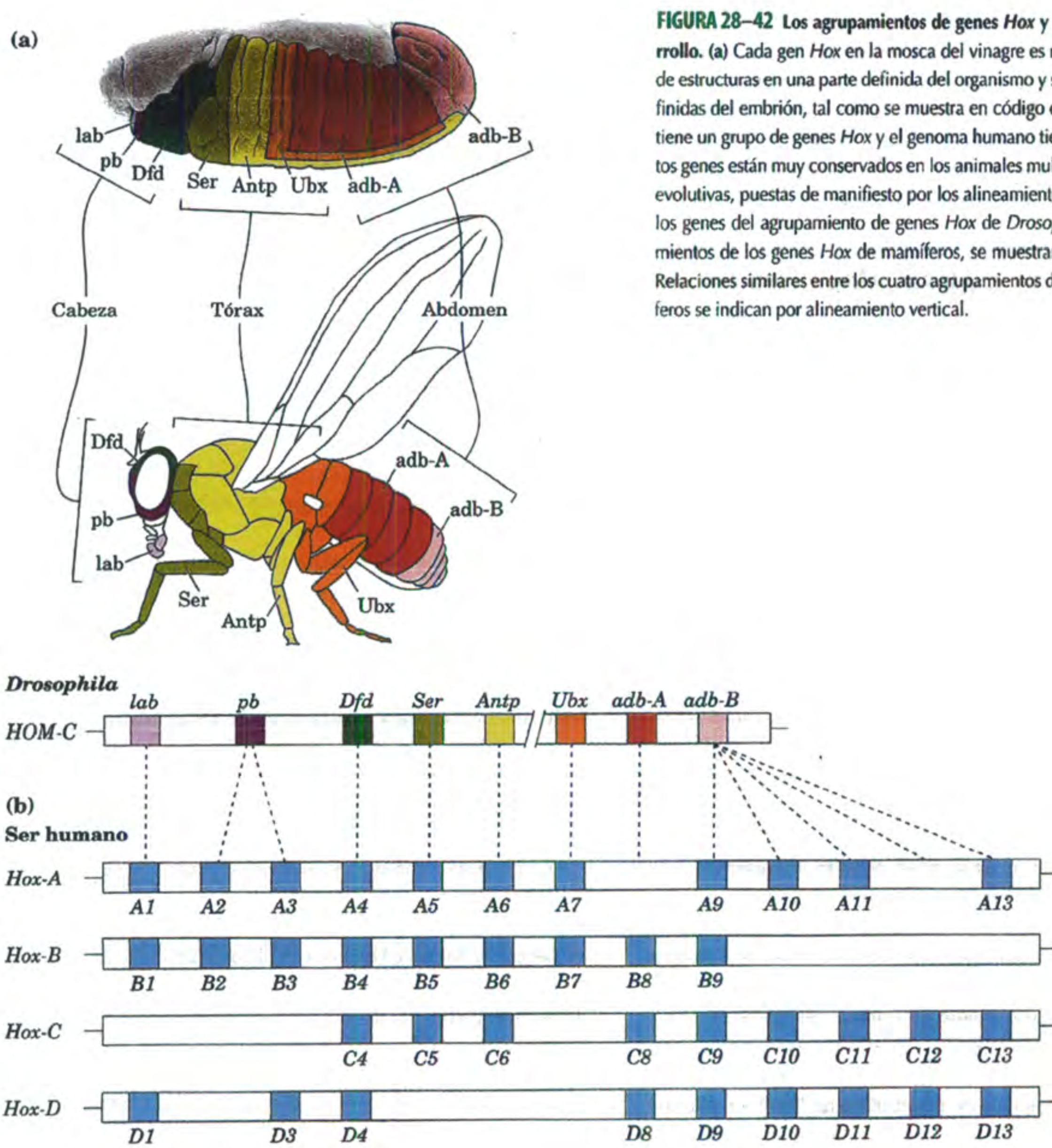


FIGURA 28–42 Los agrupamientos de genes *Hox* y sus efectos sobre el desarrollo. (a) Cada gen *Hox* en la mosca del vinagre es responsable del desarrollo de estructuras en una parte definida del organismo y se expresa en regiones definidas del embrión, tal como se muestra en código de colores. **(b)** *Drosophila* tiene un grupo de genes *Hox* y el genoma humano tiene cuatro. Muchos de estos genes están muy conservados en los animales multicelulares. Las relaciones evolutivas, puestas de manifiesto por los alineamientos de las secuencias entre los genes del agrupamiento de genes *Hox* de *Drosophila* y los de los agrupamientos de los genes *Hox* de mamíferos, se muestran por líneas discontinuas. Relaciones similares entre los cuatro agrupamientos de los genes *Hox* de mamíferos se indican por alineamiento vertical.

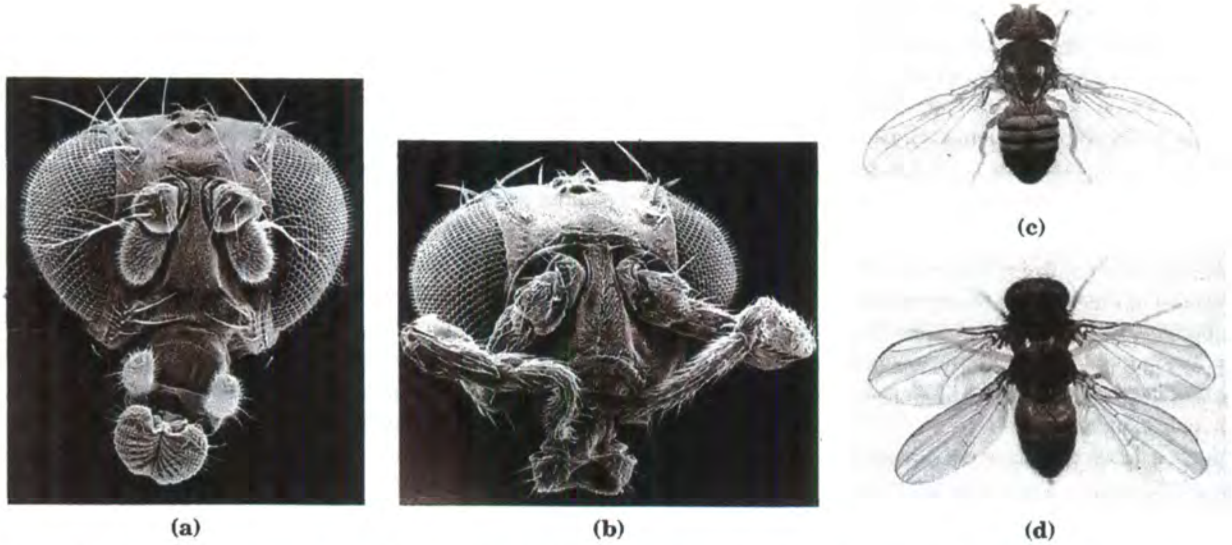


FIGURA 28–43 Efectos de mutaciones en genes *Hox* de *Drosophila*. **(a)** Cabeza normal. **(b)** Mutante homeótico (*antennapedia*) en el que las antenas se han reemplazado por patas. **(c)** Estructura corporal normal. **(d)** En otro mutante homeótico (*bitórax*), un segmento se desarrolla incorrectamente y produce un par de alas extra.

Nuestra discusión sobre la regulación del desarrollo nos devuelve al punto de partida bioquímico, tanto en el sentido literal como en el figurado. La evolución inspira de manera adecuada las primeras y las últimas palabras de este texto. Si la evolución consiste en generar el tipo de cambios en un organismo que asociamos con las diferentes especies, es el programa de desarrollo el que tiene que verse afectado. Los procesos de evolución y desarrollo van de la mano e intercambian información (Recuadro 28–1). El estudio continuado de la bioquímica está directamente implicado en la mejora del futuro de la humanidad y en la comprensión de nuestros orígenes evolutivos.

RECUADRO 28–1 Aletas, alas, picos y otras estructuras

En Sudamérica se encuentran varias especies de pinzones que se alimentan de semillas. Hace unos 3 millones de años, un pequeño grupo de pinzones de una sola especie emprendieron el vuelo desde el continente en la costa del Pacífico. Tal vez arrastrados por una tormenta, perdieron de vista la costa y viajaron cerca de 1.000 km. Pájaros muy pequeños como éstos deberían haber perecido durante semejante recorrido, pero contra toda probabilidad el grupo alcanzó una isla volcánica de un archipiélago recientemente formado, más tarde conocido como las Galápagos. Era un paisaje virgen con recursos alimenticios, tanto vegetales como insectos, sin explotar y los pinzones recién llegados sobrevivieron. Con el paso de los años, se formaron nuevas islas que fueron colonizadas por nuevas plantas e insectos, y también por los pinzones. Los pájaros aprovecharon los nuevos recursos de las islas, y grupos de pájaros se fueron especializando gradualmente, originando nuevas especies. Cuando en 1835 Charles Darwin puso el pie en las islas, había muchas especies diferentes de pinzones en las diversas islas del archipiélago, que se alimentaban de semillas, frutos, insectos, polen e incluso sangre.

La diversidad de criaturas vivientes fue causa de asombro mucho antes de que los científicos se plantearan descubrir su origen. El extraordinario legado de Darwin, inspirado en parte por su encuentro con los pinzones de las Galápagos, supuso una explicación general para la existencia de organismos con una gran variedad de apariencias y características. También planteó muchas preguntas sobre los mecanismos de la evolución. Las respuestas a estas preguntas se han empezado a producir, primero a través del estudio de los genomas y del metabolismo de los ácidos nucleicos durante la segunda mitad del siglo XX y, más recientemente, a través de la disciplina emergente conocida como evo-devo, una mezcla de biología evolutiva y del desarrollo.

En su forma actual, la teoría de la evolución tiene dos elementos principales: las mutaciones en una población generan diversidad genética; la selección natural actúa a continuación sobre esta diversidad favoreciendo a los individuos con mayores capacidades genómicas útiles y perjudicando a los restantes. Las mutaciones se producen a un ritmo significativo en el genoma de cualquier individuo, de cualquier célula (Capítulos 8 y 25). Las mutaciones ventajosas en organismos unicelulares o en la línea germinal de los organismos pluricelulares es más probable que se hereden (es decir, que se transmitan a un mayor número de descendientes) si son ventajosas. Es un esquema sencillo, pero muchos se han preguntado si es suficiente para explicar, por ejemplo, las muy diferentes formas de los picos de los pinzones de las Galápagos o la diversidad en tamaño y forma de los mamíferos. Hasta hace pocas décadas, había varias suposiciones ampliamente aceptadas sobre el proceso evolutivo: que muchas mutaciones y nuevos genes eran necesarios para crear nuevas estructuras físicas; que los organismos más complejos tendrían genomas mayores, y que especies muy diferentes ten-

drían pocos genes en común. Todas estas suposiciones eran falsas.

La genómica moderna ha revelado que el genoma humano contiene menos genes de los esperados, no muchos más que la mosca del vinagre y menos que algunos genomas de anfibios. Los genomas de los mamíferos, de los ratones a los humanos, son sorprendentemente similares en el número, el tipo y la disposición cromosómica de sus genes. Al mismo tiempo la evo-devo nos muestra la complejidad y las diferencias de las criaturas que pueden evolucionar a partir de estos genomas.

Los organismos mutantes mostrados en la Figura 28–43 fueron estudiados por el biólogo inglés William Bateson a finales del siglo XIX. Bateson usó estas observaciones para poner en duda el principio darwiniano según el cual el cambio evolutivo tenía que ser gradual. Estudios recientes de los genes que controlan el desarrollo de los organismos han revalorizado las ideas de Bateson. Cambios sutiles en los patrones de regulación durante el desarrollo, consistentes en una sola o unas pocas mutaciones, pueden dar lugar a cambios físicos notables e impulsar cambios evolutivos sorprendentemente rápidos.

Los pinzones de las Galápagos son un ejemplo magnífico del vínculo entre evolución y desarrollo. Existen al menos 14 (15 según algunos investigadores) especies de pinzones en las Galápagos, que se distinguen en buena medida por la estructura de sus picos. Los pinzones de suelo, por ejemplo, poseen picos anchos y resistentes adaptados a triturar semillas grandes y duras. Los pinzones de los cactus poseen picos más largos y finos ideales para alimentarse de frutos y flores de cactus (Fig. 1). Clifford Tabin y colaboradores examinaron cuidadosamente un conjunto de genes que se expresan durante el desarrollo craneofacial de las aves. Identificaron un gen único, *Bmp4*, cuyo nivel de expresión podía relacionarse con la formación de los picos más robustos de los pinzones de suelo. También se formaban picos más robustos en los embriones de pollo cuando se expresaban artificialmente niveles elevados de Bmp4 en los tejidos apropiados, lo que confirmaba la importancia de *Bmp4*. En un estudio similar, la formación de picos largos y finos pudo relacionarse con la expresión de calmodulina (véase la Fig. 12–11) en determinados tejidos en el estadio de desarrollo apropiado. Por lo tanto, cambios profundos en la forma y la función del pico pueden ser el resultado de cambios sutiles en la expresión de solamente dos genes implicados en la regulación del desarrollo. Son necesarias muy pocas mutaciones, y éstas afectan el desarrollo. *No* se requieren nuevos genes.

El sistema de genes reguladores que dirige el desarrollo está notablemente conservado en los vertebrados. La expresión elevada de *Bmp4* en el tejido y el momento adecuados da lugar a que las partes de la mandíbula sean más robustas en el pez cebra. El mismo gen juega un papel clave en el desarrollo de los dientes en los mamíferos. La expresión de un único gen, *Pax6*, desencadena el desarrollo de los ojos en la mosca del vinagre y en los mamíferos. El gen *Pax6* de ratón desencadena el desarrollo de ojos de mosca del vinagre en la mosca del vinagre y el gen *Pax6* de la mosca del vinagre desencadena el desarrollo de ojos de ratón en el ratón. En todos los organismos estos genes son parte de una cascada de regulación mucho más amplia que finalmente crea las estructuras correctas en las localizaciones adecuadas en cada organismo. La cascada es antigua; así, los genes *Hox* (descritos en el texto) han formado parte del programa de desarrollo de los eucariotas multicelulares durante más de 500 millones de años. Cambios sutiles en la cascada pueden tener grandes efectos sobre el desarrollo, y, por tanto, en la apariencia final del organismo. Estos mismos cambios sutiles pueden impulsar cambios evolutivos muy rápidos: las 400 o 500 especies de cíclidos (peces de aletas radiadas) en el lago Malawi y el lago Victoria en el continente africano derivan de una o unas pocas poblaciones que colonizaron estos lagos en los últimos 100.000 a 200.000 años. Los pinzones de las Galápagos simplemente siguieron el camino evolutivo que las criaturas vivientes han seguido durante miles de millones de años.

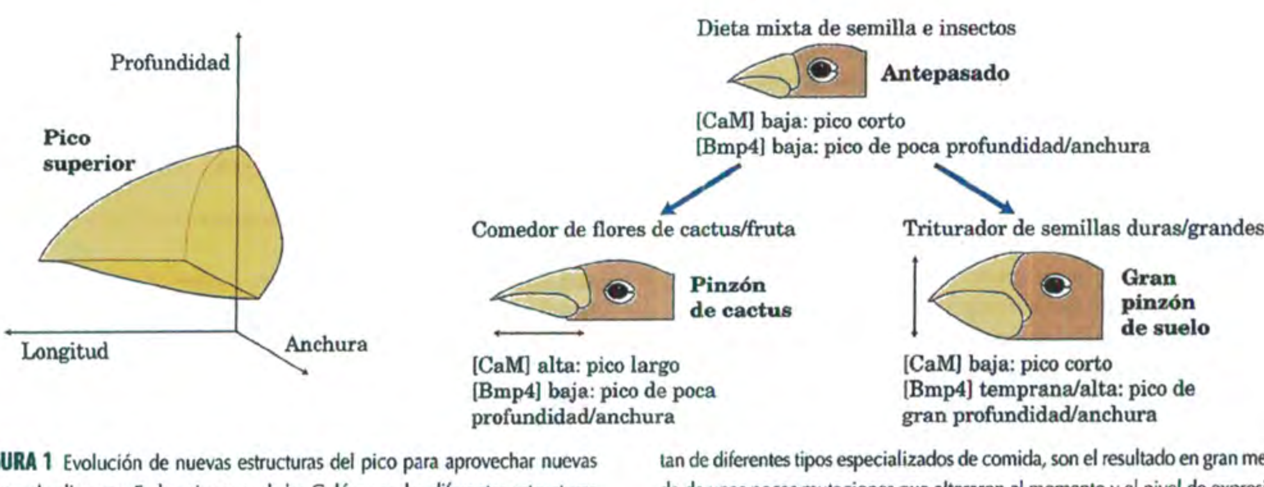


FIGURA 1 Evolución de nuevas estructuras del pico para aprovechar nuevas fuentes de alimento. En los pinzones de las Galápagos, las diferentes estructuras de los picos del pinzón de los cactus y del gran pinzón de suelo, que se alimentan de diferentes tipos especializados de comida, son el resultado en gran medida de unas pocas mutaciones que alteraron el momento y el nivel de expresión de sólo dos genes: los que codifican la calmodulina (CaM) y la Bmp4.

RESUMEN 28.3 Regulación de la expresión génica en eucariotas

- En los eucariotas la regulación positiva es más frecuente que la regulación negativa, y la transcripción está acompañada de grandes cambios en la estructura de la cromatina.

- Los promotores de Pol II tienen habitualmente una secuencia TATA y una secuencia Inr, así como múltiples sitios de unión para activadores de la transcripción. Estos sitios, a veces localizados a centenares o a miles de pares de bases de distancia de la secuencia TATA, se denominan secuencias activadoras corriente arriba en levaduras y potenciadores en los organismos eucariotas superiores.

- Por lo general, hacen falta grandes complejos proteicos para regular la actividad transcripcional. Los efectos de los activadores de la transcripción sobre la Pol II se deben a complejos de proteínas coactivadoras tales como un mediador. Las estructuras modulares de los activadores tienen distintos dominios de activación y de unión al DNA. Otros complejos proteicos, en las que se incluyen las histona acetiltransferasas y los complejos dependientes de ATP, como por ejemplo SWI/SNF y NURF, remodelan y modifican reversiblemente la estructura de la cromatina.

- Las hormonas afectan la regulación de la expresión génica de dos maneras distintas. Las hormonas esteroideas interaccionan directamente con receptores intracelulares que son proteínas reguladoras de unión a DNA; la unión de la hormona tiene tanto efectos positivos como negativos en la transcripción de los genes diana de la hormona. Las hormonas no esteroideas se unen a receptores de superficie celular, activando de este modo una vía de señalización que puede producir la fosforilación de una proteína reguladora que afecta directamente su actividad.

- La regulación mediada por RNA desempeña un papel importante en la expresión génica eucariótica, que se considera cada vez más básica.

- El desarrollo de los organismos multicelulares presenta el reto de regulación más complejo. El destino de las células en el embrión temprano está determinado por el establecimiento de los gradientes antero-posterior y dorso-ventral de las proteínas que actúan como activadores de la transcripción o de represores de la traducción, regulando de este modo los genes necesarios para el desarrollo de las estructuras correspondientes a cada parte del organismo. Existen conjuntos de genes reguladores que operan sucesivamente en el tiempo y en el espacio, transformando determinadas áreas de una célula huevo en estructuras predecibles en el organismo adulto.

Palabras clave

Los términos en negrita están definidos en el glosario.

genes constitutivos 1116
inducción 1116
represión 1116
factor de especificidad 1117
represor 1117
activador 1117
operador 1117
regulación negativa 1117
regulación positiva 1118
operón 1118
hélice-giro-hélice 1122
dedo de zinc 1122
homeodominio 1124
homeosecuencia 1124
cremallera de leucina 1124
hélice-lazo-hélice básica 1124
represión por catabolito 1126
proteína receptora de cAMP (CRP) 1126
regulón 1127
atenuación de la transcripción 1128
represor de la traducción 1131
respuesta grave 1132
ribointerruptor 1133
variación de fase 1134
remodelación de la cromatina 1137
histona acetiltransferasas (HAT) 1138
SWI/SNF 1138
intensificadores 1139
secuencias activadoras corriente arriba (UAS) 1139
activadores de la transcripción 1139
coactivadores 1139
factores de transcripción basal 1139
grupo de alta movilidad (HMG) 1139
mediador 1139
complejo de preinicio (PIC) 1140
proteína de unión a TATA (TBP) 1140
elementos de respuesta hormonal (HRE) 1143
micro-RNA (miRNA) 1145
RNA de interferencia (iRNA) 1145
ncRNA 1146
polaridad 1147
metamerismo 1147
morfógenos 1147
genes maternos 1147
mRNA maternos 1147
genes de segmentación 1147
genes gap 1147
genes de la regla par 1147
genes de la polaridad de los segmentos 1147
genes homeóticos 1147
genes *Hox* 1150

Bibliografía

General

Carroll, S.B. (2005) *Endless Forms Most Beautiful: The New Science of Evo Devo and the Making of the Animal Kingdom*, W. W. Norton & Company, New York.
Una revisión fascinante de las relaciones entre biología del desarrollo y biología evolutiva.

Müller-Hill, B. (1996) *The* lac *Operon: A Short History of a Genetic Paradigm*, Walter de Gruyter, New York.
Excelente descripción detallada de la investigación en este importante sistema.

Neidhardt, F.C. (ed.). (1996) Escherichia coli *and* Salmonella typhimurium, 2nd edn, Vol. 1: *Cellular and Molecular Biology* (Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Magasanik, B., Low, K.B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., & Umbarger, H.E., vol. eds), American Society for Microbiology, Washington, DC.
Una fuente excelente de revisiones sobre muchos operones bacterianos. La web *EcoSal* se revisa regularmente.

Sarai, A. & Kono, H. (2005) Protein-DNA recognition patterns and predictions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 379–398.

Descripción de la metodología actual para el estudio de las redes de regulación génica.

von Hippel, P.H. (2007) From "simple" DNA-protein interactions to the macromolecular machines of gene expression. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 79–105.

Excelente referencia para una descripción biofísica más detallada de las interacciones proteína-DNA y su repercusión en la expresión génica.

Regulación de la expresión génica en bacterias

Barrick, J.E. & Breaker, R.R. (2007) The power of riboswitches: discovering relics from a lost world run by RNA molecules may lead to modern tools for fighting disease. *Sci. Am.* (January), 50–57.

Coppins, R.L., Hall, K.B., & Groisman, E.A. (2007) The intricate world of riboswitches. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 176–181.

Gourse, R.L., Gaal, T., Bartlett, M.S., Appleman, J.A., & Ross, W. (1996) rRNA transcription and growth rate–dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 645–677.

Jacob, F. & Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318–356.

El modelo del operón y el concepto de RNA mensajero, presentados por vez primera en los *Comptes rendus* de la Academia Francesa de Ciencias en el año 1960, fueron propuestos en este histórico artículo.

Johnson, R.C. (1991) Mechanism of site-specific DNA inversion in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1**, 404–411.

Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., & Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 749–795.

Romby, P. & Springer, M. (2003) Bacterial translational control at atomic resolution. *Trends Genet.* **19**, 155–161.

Storz, G., Altuvia, S., & Wassarman, K.M. (2005) An abundance of RNA regulators. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 199–217.

Cubre bacterias y eucariotas.

Winkler, W.C. & Breaker, R.R. (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 487–517.

Yanofsky, C., Konan, K.V., & Sarsero, J.P. (1996) Some novel transcription attenuation mechanisms used by bacteria. *Biochimie* **78**, 1017–1024.

Regulación de la expresión génica en eucariotas

Agami, R. (2002) RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 829–834.

Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., & Lipshitz, H.D. (1998) RNA localization in development. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 335–394.

Björklund, S. & Gustafsson, C.M. (2005) The yeast mediator complex and its regulation. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 240–244.

Cerutti, H. (2003) RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet.* **19**, 9–46.

Conaway, R.C., Brower, C.S., & Conaway, J.W. (2002) Gene expression—emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254–1258.

Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., & Conaway, J.W. (2005) The mammalian mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 250–255.

Gingras, A.-C., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913–963.

Goodrich, J.A. & Kugel, J.F. (2006) Non-coding RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 12–616.

Gray, N.K. & Wickens, M. (1998) Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 399–458.

Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature* **418**, 244–251.

Kapranov, P., Willingham, A.T., & Gingeras, T.R. (2007) Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 413–423.

Describe algunas de las implicaciones de los niveles de transcripción descubiertos recientemente de la mayor parte del DNA genómico de los mamíferos.

Keene, J.D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 533–543.

Kim, Y.-J. & Lis, J.T. (2005) Interactions between subunits of *Drosophila* mediator and activator proteins. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 245–249.

Klose, R.J. & Zhang, Y. (2007) Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 307–318.

Kornberg, R.D. (2005) Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 236–239.

Luger, K. (2003) Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 127–135.

Prud'homme, B., Gompel, N., & Carroll, S.B. (2007) Emerging principles of regulatory evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8605–8612.

Reese, J.C. (2003) Basal transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 114–118.

Rivera-Pomar, R. & Jackle, H. (1996) From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet.* **12**, 478–483.

Saha, A., Wittmeyer, J., & Cairns, B.R. (2006) Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 437–447.

Saunders, A., Core, L.J., & Lis, J.T. (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 557–567.

Shahbazian, M.D. & Grunstein, M. (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 75–100.

Struhl, K. (1999) Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**, 1–4.

Thomas, M.C. & Chiang, C.-M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105–178.

Waterhouse, P.M. & Helliwell, C.A. (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 29–38.

Problemas

1. Efecto de la estabilidad del mRNA y de la proteína en la regulación Se hacen crecer células de *Escherichia coli* en un medio con glucosa como única fuente de carbono. Se añade triptófano de forma abrupta. Las células continúan creciendo y se dividen cada 30 min. Describa (cualitativamente) cómo cambia la actividad triptófano sintasa en las células bajo las siguientes condiciones:

(a) El mRNA *trp* es estable (se degrada lentamente durante muchas horas).

(b) El mRNA *trp* se degrada rápidamente, pero la triptófano sintasa es estable.

(c) El mRNA *trp* y la triptófano sintasa son ambos degradados más rápidamente de lo normal.

2. Regulación negativa Describa los efectos probables de la expresión génica en el operón *lac* de una mutación en (a) el operador *lac* que elimina la mayor parte de O_1; (b) el gen *lacI*

que inactiva el represor; (c) el promotor que altera la región en torno a la posición –10.

3. Unión específica al DNA por proteínas reguladoras Una proteína represora bacteriana típica discrimina entre su sitio específico de unión al DNA (operador) y el DNA no específico con un factor de 10^4 a 10^6. Unas 10 moléculas de represor por célula son suficientes para asegurar un elevado nivel de represión. Suponga que un represor muy similar existiese en una célula humana, con una especificidad similar para su sitio de unión. ¿Cuántas copias del represor se requerirían para obtener un nivel de represión similar al de la célula bacteriana? (Pista: El genoma de *E. coli* contiene unos 4,6 millones de pb; el genoma haploide humano tiene unos 3.200 millones de pb.)

4. Concentración del represor en *E. coli* La constante de disociación de un complejo represor-operador determinado es muy baja, alrededor de 10^{-13} m. Una célula de *E. coli* (volumen 2×10^{-12} mL) contiene 10 copias del represor. Calcule la concentración celular de la proteína represora. ¿Qué relación guarda este valor con la constante de disociación del complejo represor-operador? ¿Cuál es el significado de este resultado?

5. Represión por catabolito Células de *E. coli* se hacen crecer en un medio que contiene lactosa, pero sin glucosa. Indique si cada uno de los siguientes cambios o condiciones aumentaría, disminuiría o no cambiaría la expresión del operón *lac*. Puede ayudarle dibujar un modelo que refleje qué está sucediendo en cada situación.

(a) Adición de una elevada concentración de glucosa

(b) Una mutación que impida la disociación del represor Lac del operador

(c) Una mutación que inactive completamente la β-galactosidasa

(d) Una mutación que inactive completamente la galactósido permeasa

(e) Una mutación que impida la unión de la CRP a su sitio de unión cerca del promotor *lac*

6. Atenuación de la transcripción ¿Qué efectos tendrían las siguientes manipulaciones de la región guía del mRNA *trp* sobre la transcripción del operón *trp* de *E. coli*?

(a) Aumento de la distancia (número de bases) entre el gen del péptido guía y la secuencia 2

(b) Aumento de la distancia entre las secuencias 2 y 3

(c) Eliminación de la secuencia 4

(d) Cambio de los dos codones Trp en el gen del péptido guía por codones His

(e) Eliminación del sitio de unión al ribosoma del gen que codifica el péptido guía

(f) Cambio de varios nucleótidos en la secuencia 3 de manera que pueda aparearse con la secuencia 4 pero no con la secuencia 2

7. Represores y represión ¿De qué modo se vería afectada la respuesta SOS de *E. coli* por una mutación en el gen *lexA* que impidiese la hidrólisis autocatalítica de la proteína LexA?

8. Regulación por recombinación En el sistema de variación de fase de *Salmonella*, ¿qué efecto tendría sobre la célula que la recombinasa Hin se hiciese más activa y promoviese la recombinación (inversión del DNA) varias veces en cada generación celular?

9. Inicio de la transcripción en eucariotas Se descubre una nueva actividad RNA polimerasa en extractos crudos de células procedentes de un hongo exótico. La RNA polimerasa inicia la transcripción solamente a partir de un único promotor altamente especializado. A medida que progresa la purificación de la polimerasa su actividad se reduce y el enzima purificado es completamente inactivo a menos que se añada extracto crudo a la mezcla de reacción. Sugiera una explicación para estas observaciones.

10. Dominios funcionales en proteínas reguladoras Se reemplaza el dominio de unión al DNA de la proteína Gal4 de levadura con el dominio de unión al DNA del represor Lac y se encuentra que la proteína modificada ya no regula la transcripción de los genes *GAL* de levadura. Dibuje un diagrama de los diferentes dominios funcionales que esperaría encontrar en la proteína Gal4 y en la proteína modificada. ¿Por qué la proteína modificada ya no regula la transcripción de los genes *GAL*? ¿Qué podría hacerse en el sitio de unión al DNA reconocido por esta proteína quimérica para hacerla funcional en la activación de la transcripción de los genes *GAL*?

11. Modificación de los nucleosomas durante la activación de la transcripción Para preparar una región genómica para la transcripción, ciertas histonas en sus nucleosomas se acetilan y metilan en sitios específicos. Cuando ya no se necesita la transcripción, estas modificaciones tienen que revertirse. En los mamíferos, la metilación de los residuos Arg de las histonas es revertida por peptidilarginina desaminasas (PADI). La reacción promovida por estos enzimas no genera arginina no metilada. En su lugar, se generan residuos de citrulina en la histona. ¿Cuál es el otro producto de la reacción? Sugiera un mecanismo para esta reacción.

12. Mecanismos de la herencia en el desarrollo Un huevo de *Drosophila* que sea *bcd⁻/bcd⁻* puede desarrollarse de forma normal pero la mosca del vinagre adulta no será capaz de producir descendencia viable. Explíquelo.

Bioquímica en Internet

13. La proteína de unión a TATA y la secuencia TATA Para examinar el papel de los puentes de hidrógeno y de las interacciones hidrofóbicas entre los factores de transcripción y el DNA, vaya a FirstGlance en Jmol en http://firstglance.jmol.org y entre en PDB ID 1TGH. Este archivo contiene un modelo de la interacción entre la proteína de unión a TATA humana y un segmento de DNA de doble hebra. Una vez cargada la estructura, pulse el botón "Spin" para detener la rotación de la molécula. Cuando la estructura se haya cargado de nuevo, pulse el enlace "Contacts". Con el dial "Chains" seleccionado, pulse en cualquier parte de la proteína (la cadena A se muestra en azul) para elegirla como diana. Pulse "Show atoms contacting target" y en la lista de contactos seleccione sólo "Show putatively hydrogen-bonded non-water" para mostrar los enlaces de hidrógeno entre la proteína y el DNA de la secuencia TATA. A continuación seleccione la opción más a la derecha para visualizar las imágenes (máximo detalle: Target & Contacts Balls and Sticks, Colored by Element). Con esta vista debería ser capaz de usar el zoom, los controles de rotación y el ratón para responder a las siguientes preguntas.

(a) ¿Qué pares de bases del DNA forman enlaces de hidrógeno con la proteína? ¿De éstas, cuáles contribuyen al reconocimiento específico de la secuencia TATA por esta proteína? (La longitud de los enlaces de hidrógeno oscila entre 2,5 y 3,3 Å entre el hidrógeno dador y el hidrógeno aceptor.)

(b) ¿Qué residuos aminoácidos de la proteína interaccionan con estos pares de bases?

(c) ¿Cuál es la secuencia del DNA en este modelo y qué porciones de la secuencia son reconocidas por la proteína de unión a TATA?

(d) Examine las interacción hidrofóbicas de este complejo? ¿Son raras o numerosas? Para responder a esta pregunta pulse "Return to contacts" y examine la opción "Show hydrophobic (apolar van der Waals) interations".

Problema de análisis de datos

14. Diseño de un conmutador genético en *Escherichia coli* La regulación génica se describe a menudo como un fenómeno de todo o nada: un gen o se expresa plenamente o no se expresa en absoluto. De hecho, la represión y la activación de un gen implican interacciones de unión de ligandos que hacen que los genes puedan tener niveles de expresión intermedios cuando los niveles de moléculas reguladoras son intermedios. Por ejemplo, en el operón *lac* de E. *coli*, considere el equilibrio de unión del represor Lac, el DNA operador y el inductor (véase la Fig. 28–7). Aunque éste es un proceso complejo y cooperativo, puede ser representado aproximadamente por la siguiente reacción (R es el represor; IPTG es el inductor isopropil-β-D-tiogalactósido):

$$R + IPTG \xrightleftharpoons{K_d = 10^{-4}\ M} R \cdot IPTG$$

El represor libre, R, se une al operador e impide la transcripción del operón *lac*; el complejo R • IPTG no se une al operador y por tanto puede proseguir la transcripción del operón *lac*.

(a) Mediante la Ecuación 5–8, podemos calcular el nivel de expresión relativo de las proteínas del operón *lac* en función de [IPTG]. A partir de este cálculo, determine en qué intervalo de [IPTG] el nivel de expresión variaría entre el 10% y el 90%.

(b) Describa cualitativamente el nivel de las proteínas del operón *lac* en una célula de *E. coli* antes, durante y después de la inducción con IPTG. No es necesario que calcule las cantidades en momentos exactos; la tendencia general ya es suficiente.

Gardner, Cantor y Collins (2000) se propusieron construir un "conmutador genético", un sistema de regulación génica con las dos características clave de un interruptor de luz. (A) *Tiene sólo dos estados*: está completamente encendido o completamente apagado; no es un interruptor gradual. En términos bioquímicos, el gen diana del sistema genético (operón) se expresa plenamente o no se expresa en absoluto; no puede expresarse a nivel intermedio. (B) *Ambos estados son estables*: aunque es necesario usar un dedo para mover el interruptor de un estado a otro, una vez realizada la operación y retirado el dedo, el interruptor permanece en el estado seleccionado. En términos bioquímicos, la exposición a un inductor o a alguna otra señal cambia el estado de expresión del gen o del operón, que permanece en este estado una vez se ha eliminado la señal.

(c) Explique por qué el operón *lac* carece de las características A y B.

Para construir su "conmutador" Gardner y colaboradores diseñaron un plásmido con los siguientes componentes:

OP_{lac} La región promotora del operador del operón *lac* de *E. coli*.

OP_{λ} La región promotora del operador del fago λ.

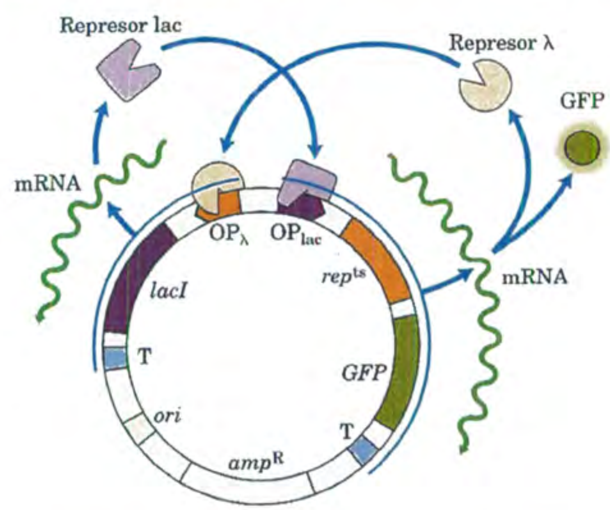
lacI El gen que codifica la proteína represora de *lac*, LacI. En ausencia de IPTG, esta proteína reprime fuertemente OP_{lac}; en presencia de IPTG, permite la expresión plena a partir de OP_{lac}.

rep^{ts} El gen que codifica un mutante sensible a temperatura de la proteína represora deλ, rep^{ts}. A 37 °C esta proteína reprime fuertemente a OP_{λ}; a 42 °C permite la expresión plena de OP_{λ}.

GFP El gen de la proteína verde fluorescente (GFP), una proteína marcadora muy fluorescente (véase la Fig. 9–15).

T Terminador de la transcripción.

Estos componentes se dispusieron de tal modo (véase la figura a continuación) que los dos promotores se reprimiesen recíprocamente: OP_{lac} controlaba la expresión de *rep*^{ts} y OP_{λ} controlaba la expresión de *lacI*. El estado del sistema se siguió a través del nivel de expresión de *GFP*, que también se encontraba bajo control de OP_{lac}.



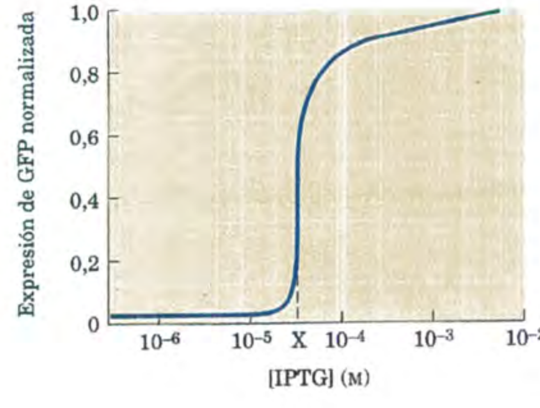
(d) El sistema construido tiene dos estados: GFP conectado (elevado nivel de expresión) y GPF desconectado (bajo nivel de expresión). Para cada estado, describa qué proteínas están presentes y qué promotores se están expresando.

(e) Esperaríamos que el tratamiento con IPTG conmutara el sistema de un estado a otro. ¿De cuál a cuál? Explique su razonamiento.

(f) Esperaríamos que el tratamiento con calor (42 °C) conmutara el sistema de un estado a otro. ¿De cuál a cuál? Explique su razonamiento.

(g) ¿Por qué esperaríamos que este plásmido tuviese las características A y B descritas anteriormente?

Para confirmar que su construcción efectivamente poseía estas características, Gardner y colaboradores primero mostraron que, una vez conectado, el nivel de expresión de GFP (alto o bajo) se mantenía estable durante largos períodos de tiempo (característica B). A continuación midieron el nivel de GFP a diferentes concentraciones del inductor IPTG, con los siguientes resultados.



Gardner y colaboradores observaron que el nivel medio de expresión de GFP era intermedio a una concentración X de IPTG.

Sin embargo, cuando procedieron a medir la expresión de GFP en *células individuales* a [IPTG] = X encontraron un nivel alto o un nivel bajo de GFP; ninguna célula mostró un nivel intermedio.

(h) Explique por qué este hallazgo demuestra que el sistema tiene la característica A. ¿Qué provoca la distribución bimodal de los niveles de expresión a [IPTG] = X?

Referencia

Gardner, T.S., Cantor, C.R., & Collins, J.J. (2000) Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* **403**, 339–342.

Glosario

a

absorción: Transporte de los productos de la digestión desde el tracto intestinal a la sangre.

aceptor de protones: Compuesto aniónico que puede aceptar un protón de un dador de protones; esto es, una base.

aceptor electrónico: Sustancia que recibe electrones en una reacción de oxidación-reducción.

ácido desoxirribonucleico: *Véase* DNA.

ácido diprótico: Ácido que tiene dos protones disociables.

ácido graso: Ácido carboxílico alifático de cadena larga que se encuentra en grasas y aceites naturales; es también componente de los fosfolípidos y glucolípidos de las membranas.

ácido graso insaturado: Ácido graso que contiene uno o más dobles enlaces.

ácido graso poliinsaturado: *Véase* PUFA.

ácido graso saturado: Ácido graso que contiene una cadena alquílica totalmente saturada.

ácido monoprótico: Ácido que sólo tiene un protón disociable.

ácido ribonucleico: *Véase* RNA.

ácidos grasos esenciales: Grupo de ácidos grasos poliinsaturados producidos por plantas pero no por el hombre; se requieren en la dieta humana.

ácidos nucleicos: Polinucleótidos que se encuentran en la naturaleza en los que los residuos nucleotídicos están unidos en una secuencia específica mediante enlaces fosfodiéster; DNA y RNA.

acidosis: Condición metabólica en la que está disminuida la capacidad de la sangre para tamponar H^+; normalmente va acompañada por un descenso del pH sanguíneo.

acil fosfato: Cualquier molécula con la fórmula química general $R{-}\underset{\displaystyle\overset{\|}{O}}{C}{-}O{-}OPO_3^{2-}$.

acoplamiento energético: Transferencia de energía de un proceso a otro.

acoplamiento quimiosmótico: Acoplamiento de la síntesis de ATP a la transferencia electrónica vía una diferencia transmembrana de carga y pH.

actina: Proteína que constituye el filamento delgado del músculo; es también un componente importante del citoesqueleto de muchas células eucarióticas.

activación de aminoácidos: Esterificación enzimática dependiente de ATP del grupo carboxilo de un aminoácido al grupo 3′-hidroxilo de su correspondiente tRNA.

activador: (1) Proteína fijadora de DNA que regula positivamente la expresión de uno o más genes, es decir, la velocidad de transcripción aumenta cuando un activador se encuentra unido al DNA. (2) Modulador positivo de un enzima alostérico.

actividad: Verdadero potencial o actividad termodinámica de una sustancia distinto de su concentración molar.

actividad específica: Número de micromoles (μmoles) de sustrato transformado por una preparación enzimática por minuto por miligramo de proteína a 25 °C; medida de la pureza de un enzima.

actividad óptica: Capacidad de una sustancia de girar el plano de la luz polarizada.

***S*-adenosilmetionina (adoMet):** Cofactor enzimático que interviene en la transferencia de grupos metilo.

adenosina difosfato: *Véase* ADP.

adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico: *Véase* AMP cíclico.

adenosina trifosfato: *Véase* ATP.

adipocito: Célula animal especializada en el almacenaje de grasas (triacilgliceroles).

ADP (adenosina difosfato): Ribonucleósido 5′-difosfato que actúa como grupo aceptor de fosfato en el ciclo energético celular.

aeróbico: Que requiere o tiene lugar en presencia de oxígeno.

aerobio: Organismo que vive en el aire y que requiere oxígeno como aceptor electrónico terminal en la respiración.

afín (cognado): Describe dos biomoléculas que interaccionan normalmente; por ejemplo, un enzima y su sustrato normal o un receptor y su ligando normal.

agente desacoplante: Sustancia que desacopla la fosforilación de ADP de la transferencia electrónica; por ejemplo, el 2,4-dinitrofenol.

agente oxidante (oxidante): Aceptor de electrones en una reacción de oxidación-reducción.

agente reductor (reductor): Dador electrónico en una reacción de oxidación-reducción.

agonista: Compuesto, normalmente una hormona o neurotransmisor, que provoca una respuesta fisiológica cuando se une a su receptor específico.

alcalosis: Condición metabólica en la que está disminuida la capacidad corporal para tamponar OH^-; normalmente va compañada de un aumento del pH sanguíneo.

aldosa: Azúcar sencillo en el que el átomo de carbono carbonílico es un aldehído, es decir, el carbono carbonílico se encuentra en un extremo de la cadena carbonada.

aminoácidos: Ácidos carboxílicos con un sustituyente α-amino; son los elementos primarios que constituyen las proteínas.

aminoácidos cetogénicos: Aminoácidos con esqueletos carbonados que pueden servir de precursores de los cuerpos cetónicos.

aminoácidos esenciales: Aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el ser humano (ni por otros vertebrados) y que deben ser obtenidos mediante la dieta.

aminoácidos glucogénicos: Aminoácidos con cadenas carbonadas que se pueden convertir metabólicamente en glucosa o glucógeno vía gluconeogénesis.

aminoácidos no esenciales: Aminoácidos que pueden ser sintetizados por el ser humano y otros vertebrados a partir de precursores, por lo que no se requieren en la dieta.

aminoacil-tRNA: Éster aminoacilo de un tRNA.

aminoacil-tRNA sintetasas: Enzimas que catalizan la síntesis de un aminoacil-tRNA a expensas de la energía del ATP.

aminotransferasas: Enzimas que catalizan la transferencia de grupos amino desde α-aminoácidos a α-cetoácidos.

amonotélico: Que excreta el exceso de nitrógeno en forma de amoníaco.

AMP cíclico (cAMP): Segundo mensajero; su formación en una célula por la adenilil ciclasa es estimulada por ciertas hormonas u otras señales moleculares.

anabolismo: Fase del metabolismo intermediario que se ocupa de la biosíntesis dependiente de energía de los componentes celulares a partir de precursores más pequeños.

anaeróbico: Que tiene lugar en ausencia de aire u oxígeno.

anaerobio: Organismo que vive en ausencia de oxígeno. Los anaerobios obligados mueren al entrar en contacto con el oxígeno.

análisis por protección (footprinting): Técnica para identificar la secuencia de ácido nucleico a la que se ha unido una proteína fijadora de DNA o RNA.

analito: Molécula que se ha de analizar mediante espectrometría de masas.

anamox: Oxidación anaeróbica del amoníaco a N_2, utilizando nitrito como aceptor electrónico; la llevan a cabo bacterias quimiolitotróficas especializadas.

anemia falciforme: Enfermedad humana caracterizada por moléculas defectuosas de hemoglobina en individuos homozigóticos respecto a un alelo mutante que codifica las cadenas β de la hemoglobina.

anfolito: Sustancia que tanto puede actuar como base que como ácido.

anfipático: Que contiene a la vez dominios polares y apolares.

anfotérico: Capaz de dar y aceptar protones, por lo que sirve tanto de ácido como de base.

angstrom (Å): Unidad de longitud (10^{-8} cm) utilizada para indicar dimensiones moleculares.

anhídrido: Producto de la condensación de dos grupos carboxilo o fosfato en la que se eliminan los elementos del agua para formar un compuesto con la estructura general $R{-}\underset{\overset{\|}{O}}{X}{-}O{-}\underset{\overset{\|}{O}}{X}{-}R$, en donde X es carbono o fósforo.

anómeros: Dos estereoisómeros de un azúcar dado que difieren únicamente en la configuración alrededor del átomo de carbono carbonílico (anomérico).

antagonista: Compuesto que interfiere con la acción fisiológica de otra sustancia (el agonista), normalmente en un receptor hormonal o de neurotransmisor.

antibiótico: Uno de los muchos productos orgánicos formado y secretado por diversas especies de microorganismos y plantas; son tóxicos para otras especies y tienen, posiblemente, una función defensiva.

anticodón: Secuencia específica de tres nucleótidos en un tRNA, complementaria de un codón de un aminoácido en un mRNA.

anticuerpo: Proteína de defensa sintetizada por el sistema inmune de los vertebrados. *Véase también* inmunoglobulina.

anticuerpos monoclonales: Anticuerpos producidos por una célula hibridoma clonada, por lo que son idénticos y dirigidos contra el mismo epítopo del antígeno.

anticuerpos policlonales: Conjunto heterogéneo de anticuerpos producidos en un animal por una serie de linfocitos B diferentes en respuesta a un antígeno. Diferentes anticuerpos del conjunto reconocen partes diferentes del antígeno.

antígeno: Molécula capaz de producir la síntesis de un anticuerpo específico en vertebrados.

antiparalelo: (1) Describe dos polímeros lineales con polaridad u orientación opuestas. (2) Se dice del movimiento de dos sustancias en dirección opuesta.

apareamiento incorrecto (mismatch): Par de bases en un ácido nucleico que no puede formar pares de Watson-Crick normales.

apoenzima: Parte proteica de un enzima sin ninguno de los cofactores o grupos prostéticos orgánicos o inorgánicos que se puedan necesitar para la actividad catalítica.

apolar: Hidrofóbico; describe moléculas o grupos poco solubles en agua.

apolipoproteína: Componente proteico de una lipoproteína.

apoproteína: Porción proteica de una proteína sin ninguno de los cofactores orgánicos o inorgánicos o grupos prostéticos que puedan ser necesarios para la actividad.

apoptosis: Muerte celular programada en la que una célula provoca su propia muerte y lisis, señalada desde el exterior o programada en sus genes, al degradar sitemáticamente sus propias macromoléculas.

aptámero: Oligonucleótido que se une específicamente a una diana molecular, seleccionado normalmente mediante un ciclo iterativo de enriquecimiento basado en la afinidad (SELEX).

Archaea: Uno de los cinco reinos de los organismos vivos; incluye muchas especies que se desarrollan en ambientes extremos de elevada fuerza iónica, alta temperatura o pH bajo.

arrestinas: Familia de proteínas que se unen a la región carboxi-terminal fosforilada de receptores acoplados a proteína G impidiendo su interacción con las proteínas G, con lo que finaliza la señal a través de estos receptores.

atenuador: Secuencia de RNA que interviene en la regulación de la expresión de ciertos genes; funciona como terminador de la transcripción.

átomo de carbono asimétrico: Átomo de carbono que está unido de manera covalente a cuatro grupos diferentes por lo que puede existir en dos configuraciones tetraédricas diferentes.

ATP (adenosina trifosfato): Ribonucleósido 5′-trifosfato que actúa como dador de grupo fosfato en el ciclo energético celular; transporta energía química entre rutas metabólicas actuando de intermediario compartido que acopla reacciones endergónicas y exergónicas.

ATP sintasa: Complejo enzimático que forma ATP a partir de ADP y fosfato durante la fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna o en la membrana plasmática bacteriana y durante la fotofosforilación en los cloroplastos.

ATPasa: Enzima que hidroliza ATP dando ADP y fosfato; normalmente acoplada a algún proceso que requiere energía.

autofosforilación: En sentido estricto, la fosforilación de un residuo aminoácido de una proteína catalizada por la misma molécula. A menudo se amplía para incluir la fosforilación de una subunidad de un homodímero por la otra subunidad.

autótrofo: Organismo que puede sintetizar sus propias moléculas complejas a partir de fuentes de carbono y nitrógeno muy sencillas, como el dióxido de carbono y el amoníaco.

auxina: Hormona de crecimiento vegetal.

azúcar reductor: Azúcar en el que el carbono carbonílico (anomérico) no está implicado en un enlace glucosídico, por lo que se puede oxidar.

b

Bacteria: Uno de los cinco reinos de los organismos vivos; las bacterias tienen una membrana plasmática pero no orgánulos internos o núcleo.

bacteriófago: Virus capaz de replicarse en una célula bacteriana; también llamado fago.

balanceo (wobble): Apareamiento de bases relativamente laxo en el extremo 3′ de un codón y la base complementaria en el extremo 5′ del anticodón.

BAT: *Véase* tejido adiposo marrón.

biblioteca genómica: Genoteca de DNA que contiene segmentos de DNA que representan todas (o la mayoría) de secuencias del genoma de un organismo.

bicapa: Doble capa de moléculas lipídicas anfipáticas orientadas que forman la estructura básica de las membranas biológicas. Las colas hicrocarbonadas se encaran hacia el interior formando una fase apolar continua.

biocitina: Residuo aminoácido conjugado formado por la unión covalente de la biotina con un residuo Lys a través de un enlace amida.

bioensayo: Método para medir la cantidad de una sustancia biológicamente activa (tal como una hormona) en una muestra por cuantificación de la respuesta biológica a alícuotas de esta muestra.

bioinformática: Análisis computerizado de datos biológicos, utilizando métodos procedentes de la estadística, la lingüística, la matemáticas, la química, la bioquímica y la física. Los datos son a menudo secuencias o datos estructurales de ácidos nucleicos o proteínas, pero también pueden incluirse datos de muchas fuentes, estadísticas de pacientes y materiales de la literatura científica. La investigación en bioinformática se centra en métodos para el almacenamiento de datos y su recuperación y análisis.

biología de sistemas: Estudio de sistemas biológicos complejos, que integran las funciones de varias o todas las macromoléculas de una célula (RNA, DNA, proteínas).

biomolécula: Compuesto orgánico presente normalmente como componente esencial de seres vivos.

biopterina: Cofactor enzimático derivado de la pterina y que interviene en ciertas reacciones de oxidación-reducción.

biosfera: Toda la materia viva de la tierra, mares y atmósfera.

biotina: Una vitamina; cofactor enzimático utilizado en reacciones de carboxilación.

c

cadena respiratoria: Cadena de transferencia electrónica; secuencia de proteínas transportadoras de electrones que transfieren electrones desde los sustratos al oxígeno molecular en las células aeróbicas.

calor específico: Cantidad de energía (en joules o en calorías) necesaria para elevar la temperatura de 1 g de una sustancia pura en 1 °C.

caloría: Cantidad de calor requerida para elevar la temperatura de 1,0 g de agua de 14,5 a 15,5 °C. Una caloría (cal) equivale a 4,18 joules (J).

cAMP: *Véase* AMP cíclico.

canal iónico: Proteína integral que permite el transporte regulado de un ión específico, o iones, a través de una membrana.

canalización: Transferencia directa de un producto de una reacción (intermediario común) desde el sitio activo de un enzima al del enzima que cataliza el siguiente paso de la ruta.

canalización de sustratos: Movimiento de intermediarios químicos en una serie de reacciones catalizadas por enzimas desde el sitio activo de un enzima al sitio activo del siguiente enzima de la ruta sin abandonar la superficie de un complejo enzimático formado por los dos enzimas.

CAP: *Véase* proteína receptora de cAMP.

cápsida: Cubierta proteica de un virión o partícula vírica.

carbanión: Átomo de carbono cargado negativamente.

carbocatión: Átomo de carbono cargado positivamente; también se denomina ión carbonio.

carbono anomérico: Átomo de carbono de un azúcar en el nuevo estereocentro formado cuando un azúcar se cicla a su forma hemiacetal. Éste es el carbono carbonílico de aldehídos y cetonas.

carga energética: Fracción del sistema ATP/ADP/AMP llena de grupos fosfato de alta energía.

carotenoides: Pigmentos fotosintéticos liposolubles formados por unidades de isopreno.

cascada: *Véase* cascada enzimática.

cascada enzimática: Serie de reacciones, a menudo implicadas en procesos reguladores, en las que un enzima activa otro (a menudo por fosforilación), el cual activa un tercer enzima y así sucesivamente. El efecto de que un catalizador active otro catalizador es una gran amplificación de la señal que originó la cascada.

catabolismo: Fase del metabolismo intermediario relativa a la degradación de moléculas de nutrientes que producen energía.

catálisis ácido-base específica: Catálisis ácida o básica en la que intervienen los constituyentes del agua (iones hidróxido o hidronio).

catálisis ácido-base general: Catálisis en la que interviene la transferencia de uno o varios protones desde una molécula a otra que no sea el agua.

catecolaminas: Hormonas, tales como la adrenalina, que son derivados aminados del catecol.

catenado: Dos o más moléculas poliméricas circulares con un enlace topológico no covalente que se parece a los eslabones de una cadena.

cDNA: *Véase* DNA complementario.

cebado: (1) En la fosforilación de proteínas se refiere a la fosforilación de un residuo aminoácido que se transforma en el sitio de unión y punto de referencia para la fosforilación de otros residuos en la misma proteína. (2) En la replicación del DNA, síntesis de un oligonucleótido corto al que las DNA polimerasas pueden añadir nucleótidos adicionales.

cebador: Oligómero corto (de azúcares o nucleótidos) a los que el enzima adiciona nuevas subunidades monoméricas.

célula B: *Véase* linfocito B.

célula epitelial: Cualquier célula que forma parte de la cubierta exterior de un organismo u órgano.

célula germinal: Tipo de célula animal que se forma tempranamente durante la embriogénesis y que se puede multiplicar por mitosis o puede producir por meiosis células que se transforman en gametos (óvulos o espermatozoides).

células facultativas: Células que pueden vivir tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

células pluripotentes (madre): Células comunes autorregenerantes de la médula ósea que dan lugar a células sanguíneas diferenciadas tales como los eritrocitos y los linfocitos.

células somáticas: Todas las células del cuerpo con excepción de las células germinales.

centrigufación diferencial: Separación de orgánulos celulares u otras partículas de tamaño diferente por sus distintas velocidades de sedimentación en un campo centrífugo.

centro de reacción fotoquímico: Parte de un complejo fotosintético en donde la energía de un fotón absorbido produce separación de carga, con lo que se inicia la transferencia de electrones.

centro ferro-sulfurado: Grupo prostético de ciertas proteínas redox que intervienen en transferencias de electrones; el Fe^{2+} o Fe^{3+} está unido a azufre inorgánico y a grupos Cys de la proteína.

centro quiral: Átomo con sustituyentes dispuestos de manera que la molécula no se puede superponer con su imagen especular.

centrómero: Sitio especializado dentro de un cromosoma que sirve de punto de fijación del huso mitótico o meiótico.

cerebrósido: Esfingolípido que contiene un residuo glucídico como grupo de cabeza.

cetosa: Monosacárido sencillo en el que el grupo carbonílico es una cetona.

cetosis: Condición en la que la concentración de cuerpos cetónicos en la sangre, tejidos y orina es anormalmente elevada.

ciclina: Cualquiera de los miembros de una familia de proteínas que activan proteína quinasas dependientes de ciclina, regulando de este modo el ciclo celular.

ciclo de Calvin: Ruta cíclica utilizada por las plantas para fijar dióxido de carbono y producir triosas fosfato.

ciclo de Krebs: *Véase* ciclo del ácido cítrico.

ciclo de la urea: Ruta metabólica en el hígado de los vertebrados para la síntesis de urea a partir de grupos amino y dióxido de carbono.

ciclo de los ácidos tricarboxílicos: *Véase* ciclo del ácido cítrico.

ciclo del ácido cítrico: Ruta cíclica para la oxidación de residuos acetilo a dióxido de carbono en el que el primer paso es la formación de ácido cítrico; también se le conoce como ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

ciclo del glioxilato: Variante del ciclo del ácido cítrico para la conversión neta de acetato en succinato y, en último término, nuevo glúcido; presente en bacterias y en algunas plantas.

ciclo del nitrógeno: Ciclación de diversas formas de nitrógeno biológicamente asequible a través de los reinos vegetal, animal y microbiano y a través de la atmósfera y la geosfera.

ciclo inútil: Ciclo de reacciones catalizadas enzimáticamente que dan lugar a la liberación de energía térmica por hidrólisis de ATP.

cinética: Estudio de las velocidades de reacción.

cinética de Michaelis-Menten: Patrón cinético en el que la velocidad inicial de una reacción catalizada enzimáticamente muestra una dependencia hiperbólica con respecto a la concentración de sustrato.

cistrón: Unidad de DNA o RNA que corresponde a un gen.

citocromo P-450: Familia de enzimas que contienen hemo, con una banda de absorción característica a 450 nm, que participan en hidroxilaciones biológicas con O_2.

citocromos: Proteínas con hemo que actúan de transportadores electrónicos en la respiración, fotosíntesis y otras reacciones de oxidación-reducción.

citoesqueleto: Red filamentosa que proporciona estructura y organización al citoplasma; incluye los filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios.

citoplasma: Porción de los contenidos de una célula fuera del núcleo pero dentro de la membrana plasmática; incluye orgánulos tales como las mitocondrias.

citoquina: Miembro de una familia de proteínas pequeñas secretadas (tales como las interleuquinas o los interferones) que activan la división celular o la difenciación uniéndose a receptores de la membrana plasmática en las células sensibles.

citoquinesis: Separación final de las células hijas después de la mitosis.

citosol: Fase acuosa continua del citoplasma con sus solutos disueltos; excluye orgánulos tales como las mitocondrias.

clonación: Producción de gran cantidad de moléculas de DNA, células u organismos idénticos a partir de una sola molécula de DNA o célula progenitora.

clonación del DNA: *Véase* clonación.

clones: Los descendientes de una sola célula.

clorofilas: Familia de pigmentos verdes que funcionan como receptores de energía luminosa en la fotosíntesis; complejos de magnesio-porfirina.

cloroplastos: Orgánulos fotosintéticos presentes en algunas células eucarióticas; contienen clorofila.

cobalamina: *Véase* coenzima B_{12}.

cociente de acción de masas (Q): Para la reacción aA + bB $\rightleftharpoons$ cC + dD, la razón es: $[C]^c [D]^d/[A]^a [B]^b$

código degenerado: Código en el que un elemento de un lenguaje está especificado por más de un elemento en un segundo lenguaje.

código genético: Conjunto de palabras codificadas en forma de tripletes en el DNA (o mRNA) que codifica los aminoácidos de las proteínas.

codón: Secuencia de tres nucleótidos adyacentes en un ácido nucleico que codifica un aminoácido específico.

codón de inicio: AUG (a veces GUG o aún más raramente UUG en bacterias y arqueobacterias); codifica el primer aminoácido de una secuencia polipeptídica; *N*-formilmetionina en bacterias y metionina en arqueobacterias y eucariotas.

codón sin sentido: Codón que no especifica un aminoácido pero que señala la finalización de una cadena polipeptídica.

codones de stop: *Véase* codones de terminación.

codones de terminación: UAA, UAG y UGA; en la síntesis de proteínas señalan la terminación de una cadena polipeptídica. Se conocen también como codones de stop.

coeficiente de actividad: Factor por el que se ha de multiplicar el valor numérico de la concentración de un soluto para obtener su verdadera actividad termodinámica.

coeficiente de Hill: Medida de la interacción cooperativa entre subunidades proteicas.

coeficiente de partición: Constante que expresa la proporción en que un soluto determinado se reparte o distribuye entre dos líquidos inmiscibles dados en el equilibrio.

coeficiente de sedimentación: Constante física que expresa la velocidad de sedimentación de una partícula en un campo centrífugo en condiciones especificadas.

coenzima: Cofactor orgánico requerido para la acción de ciertos enzimas; a menudo contienen una vitamina como componente.

coenzima A: Coenzima que contiene ácido pantoténico y que actúa como grupo transportador de acilo en ciertas reacciones enzimáticas.

coenzima B_{12}: Cofactor enzimático derivado de la vitamina cobalamina que interviene en ciertos tipos de reordenamientos del esqueleto carbonado.

cofactor: Ión inorgánico o coenzima necesario para la actividad enzimática.

cointegrado: Intermediario en la migración de ciertos transposones de DNA en los que el DNA dador y el DNA diana están unidos covalentemente.

cola de poli(A): Extensión de residuos de adenosina añadidos al extremo 3′ de muchos mRNA de eucariotas (y a veces en bacterias).

complejo de Golgi: Orgánulo membranoso complejo de células eucarióticas; actúa en la modificación postraducción de las proteínas y en su secreción de la célula o en la incorporación en la membrana plasmática o membranas de orgánulos.

complejo de inicio: Complejo de un ribosoma con un mRNA y el Met-tRNA^{Met} o fMet-tRNA^{fMet} iniciadores, listo para los pasos de elongación.

complejo de la nitrogenasa: Sistema de enzimas capaz de reducir el nitrógeno atmosférico a amoníaco en presencia de ATP.

complementario: Que tiene una superficie molecular con grupos químicos dispuestos de modo que interaccionan específicamente con grupos químicos de otra molécula.

compuesto de alta energía: Compuesto que al hidrolizarse experimenta una gran disminución de energía libre en condiciones estándar.

compuesto fosfato de bajo contenido energético: Compuesto fosforilado con una energía libre estándar de hidrólisis bastante baja.

compuesto quiral: Compuesto que contiene un centro asimétrico (átomo quiral o centro quiral), por lo que puede existir en dos formas especulares no superponibles (enantiómeros).

configuración: Ordenamiento espacial de una molécula orgánica que le viene dado por la presencia de (1) dobles enlaces alrededor de los cuales no existe libertad de giro o (2) centros quirales, alrededor de los cuales los grupos sustituyentes están dispuestos en una secuencia específica. Los isómeros configuracionales no se pueden interconvertir sin la rotura de uno o más enlaces covalentes.

condroitina sulfato (sulfato de condroitina): Miembro de una familia de glucosaminoglucanos sulfatados; componente principal de la matriz extracelular.

configuración absoluta: Configuración de cuatro grupos sustituyentes diferentes alrededor de un carbono asimétrico en relación al D- y L-gliceraldehído.

conformación: Ordenamiento espacial de grupos sustituyentes que tienen libertad para adoptar posiciones diferentes en el espacio, sin rotura de enlaces debido a la libertad de rotación de enlace.

conformación *b*: Ordenamiento extendido en zig-zag de una cadena polipeptídica; estructura secundaria común en las proteínas.

conformación nativa: Conformación biológicamente activa de una macromolécula.

constante de disociación: Constante de equilibrio (K_d) de la disociación de un complejo de dos o más biomoléculas en sus componentes; por ejemplo, disociación de un sustrato de un enzima.

constante de disociación ácida: Constante de disociación (K_a) de un ácido que describe su disociación en su base conjugada y un protón.

constante de equilibrio (K_{eq}): Constante característica de cada reacción química; relaciona las concentraciones específicas de todos los reactivos y productos en el equilibrio a una presión y temperatura determinadas.

constante de Michaelis (K_m): Concentración de sustrato a la que una reacción enzimática tiene lugar a la mitad de su velocidad máxima.

constante de velocidad: Constante de proporcionalidad que relaciona la velocidad de una reacción química con la(s) concentración(es) del reactivo(s).

cóntigo: Serie de clones solapantes o secuencia continua que define una sección ininterrumpida de un cromosoma.

control de la traducción: Regulación de la síntesis de una proteína por regulación de la velocidad de su traducción en el ribosoma.

control de la transcripción: Regulación de la síntesis de una proteína por regulación de la síntesis de su mRNA.

control metabólico: Mecanismos mediante los que se cambia el flujo a través de una ruta metabólica para reflejar las circunstancias alteradas de la célula.

control por aceptor: Regulación de la velocidad de respiración en función de la disponibilidad de ADP como grupo aceptor de fosfato.

cooperatividad: Característica de un enzima u otra proteína en la que la unión de la primera molécula de un ligando cambia la afinidad hacia la segunda molécula. En la cooperatividad positiva, la afinidad por la segunda molécula de ligando aumenta; en la cooperatividad negativa, disminuye.

cooperatividad negativa: Propiedad de algunos enzimas o proteínas con varias subunidades en los que la fijación de un ligando o sustrato a una subunidad dificulta la fijación a otra subunidad.

cooperatividad positiva: Propiedad de algunos enzimas o proteínas con varias subunidades en los que la unión de un ligando o sustrato a una subunidad facilita la unión a otra subunidad.

corrección de pruebas: Corrección de errores en la síntesis de un biopolímero que contiene información por eliminación de subunidades monoméricas incorrectas después de haber sido adicionadas covalentemente al polímero en crecimiento.

corte y empalme (splicing): *Véase* corte y empalme de un gen; corte y empalme del RNA.

corte y empalme de un gen: Unión enzimática de un gen, o parte de un gen, a otro.

corte y empalme del RNA: Eliminación de intrones y unión de exones en un transcrito primario.

corticosteroides: Hormonas esteroideas producidas por la corteza adrenal.

cotransporte: Transporte simultáneo, por un único transportador, de dos solutos a través de

una membrana. *Véase también* cotransporte paralelo y cotransporte antiparalelo.

cotransporte antiparalelo (antiport): Cotransporte de dos solutos en direcciones opuestas a través de una membrana.

cotransporte paralelo (symport): Cotransporte de solutos a través de una membrana en la misma dirección.

cremallera de leucina: Motivo proteico estructural implicado en interacciones proteína-proteína en muchas proteínas reguladoras eucarióticas; consiste en dos hélices α interaccionantes en las que la presencia de residuos Leu cada siete residuos constituye una característica prominente de las superficies interaccionantes.

crestas: Plegamientos de la membrana mitocondrial interna.

cristalografía de rayos X: Análisis de los patrones de difracción de rayos X de un compuesto cristalino utilizado para estudiar la estructura tridimensional de la molécula.

cromatina: Complejo filamentoso de DNA, histonas y otras proteínas que constituyen el cromosoma eucariótico.

cromatografía: Proceso por el que se separan mezclas complejas de moléculas mediante múltiples particiones repetidas entre una fase fluida (móvil) y una fase estacionaria.

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): Procedimientos cromatográficos, a menudo realizados a presiones relativamente elevadas, utilizando un utillaje automático que permite la obtención de perfiles refinados y muy reproducibles.

cromatografía por exclusión de tamaño: Procedimiento para la separación de moléculas en base a su tamaño; se fundamenta en la capacidad de polímeros porosos para excluir solutos por encima de un tamaño determinado. También se denomina filtración en gel.

cromosoma: Molécula única y grande de DNA y sus proteínas asociadas, que contiene muchos genes; almacena y transmite información genética.

CRP: *Véase* proteína receptora de cAMP.

cruciforme: Estructura secundaria del RNA o DNA de doble cadena en la que la doble hélice se desnaturaliza en secuencias repetidas palindrómicas en cada cadena y en la que cada cadena separada se aparea internamente para formar estructuras en horquilla opuestas. *Véase también* horquilla.

cuanto: Unidad básica de energía.

cuerpos cetónicos: Acetoacetato, D-β-hidroxibutirato y acetona; combustibles hidrosolubles exportados normalmente por el hígado pero formados en exceso durante el ayuno o en la diabetes mellitus sin tratar.

cultivo de tejidos: Método mediante el que se hacen crecer en medios líquidos células procedentes de organismos multicelulares.

curva de titulación: Gráfica del pH frente a equivalentes de base adicionados durante la valoración de un ácido.

d

dador de protones: Dador de un protón en una reacción ácido-base; esto es, un ácido.

dador electrónico: Sustancia que cede electrones en una reacción de oxidación-reducción.

dalton: Unidad de masa atómica o molecular. 1 dalton (Da) es la masa de un átomo de hidrógeno ($1{,}66 \times 10^{-24}$ g).

dedo de zinc: Motivo proteico especializado implicado en el reconocimiento del DNA por algunas proteínas de unión al DNA; caracterizado por un único átomo de zinc coordinado a cuatro residuos Lys o a dos residuos His y dos Lys.

densidad superhelicoidal: En una molécula helicoidal tal como el DNA, número de superenrollamientos (giros superhelicoidales) en relación al número de espirales (giros) en la molécula relajada.

desaminación: Eliminación enzimática de grupos amino de biomoléculas tales como aminoácidos o nucleótidos.

desaturasas: Enzimas que catalizan la introducción de dobles enlaces en la parte hidrocarbonada de los ácidos grasos.

desensibilización: Proceso universal por el que mecanismos sensoriales dejan de responder después de una exposición prolongada al estímulo que detectan.

deshidrogenasas: Enzimas que catalizan la eliminación de pares de átomos de hidrógeno de sus sustratos.

deshidrogenasas ligadas a flavina: Deshidrogenasas que requieren uno de los coenzimas de la riboflavina, FMN o FAD.

desnaturalización: Desplegamiento parcial o completo de la conformación nativa específica de una cadena polipeptídica, proteína o ácido nucleico, de modo que se pierde la función de la molécula.

desolvatación: En solución acuosa la liberación de agua que rodea un soluto.

desoxirribonucleótidos: Nucleótidos que contienen 2-desoxi-D-ribosa como pentosa.

desplazamiento de marco: Mutación causada por la inserción o deleción de uno o más nucleótidos apareados, que cambia el marco de lectura de los codones durante la síntesis de proteínas; el producto polipeptídico tiene una secuencia de aminoácidos alterada a partir del codón mutado.

desplazamiento del marco de traducción: Cambio programado en el marco de lectura durante la traducción de un mRNA en un ribosoma, que puede tener lugar según diversos mecanismos.

destino de proteínas: Proceso mediante el que proteínas recién sintetizadas se clasifican y transportan a sus localizaciones propias dentro de la célula.

deuda de oxígeno: Oxígeno extra (por encima del nivel normal de reposo) consumido en el período de recuperación después de un ejercicio físico extenuante.

diabetes mellitus: Grupo de enfermedades metabólicas con síntomas que son debidos a una deficiencia en la producción o utilización de insulina; se caracteriza por el fallo en el transporte de glucosa desde la sangre a la células a concentraciones de glucosa normales.

diálisis: Eliminación de moléculas pequeñas de una solución de una macromolécula por su difusión a través de una membrana semipermeable hacia una solución tamponada.

diferenciación: Especialización de la estructura y función celulares durante el crecimiento y en el desarrollo.

diferenciación celular: Proceso por el que una célula precursora se especializa para realizar una función particular mediante la adquisición de un nuevo complemento de proteínas y RNA.

difusión: Movimiento neto de moléculas en dirección de la concentración menor.

difusión facilitada: Difusión de una sustancia polar a través de una membrana biológica mediante una proteína transportadora; también llamada difusión pasiva o transporte pasivo.

difusión simple: Movimiento de moléculas de soluto a través de una membrana a una región de menor concentración sin la ayuda de un transportador proteico.

digestión: Hidrólisis enzimática de los nutrientes principales en el sistema gastrointestinal dando componentes más sencillos.

dímero de pirimidina: Dímero unido covalentemente de dos residuos pirimidínicos adyacentes en el DNA, inducido por la absorción de luz UV; en su mayor parte provienen de dos timinas adyacentes (dímero de timina).

dímero de timina: *Véase* dímero de pirimidina.

diploide: Que tiene dos conjuntos de información genética; describe una célula con dos cromosomas de cada tipo. *Compárese* con haploide.

dipolo: Molécula que tiene a la vez cargas positivas y negativas.

disacárido: Glúcido que consiste en dos unidades monosacáridas unidas covalentemente.

DNA (ácido desoxirribonucleico): Polinucleótido con una secuencia específica de unidades de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente con enlaces 3′,5′-fosfodiéster; es portador de la información genética.

DNA complementario (cDNA): DNA complementario de un mRNA determinado utilizado en la clonación de DNA producido normalmente por la transcriptasa inversa.

DNA heterodúplex: Dúplex de DNA que contiene hebras complementarias procedentes de dos moléculas de DNA diferentes con secuencias similares, a menudo como producto de la recombinación genética.

DNA ligasa: Enzima que crea un enlace fosfodiéster entre el extremo 3′ de un segmento de DNA y el extremo 5′ de otro.

DNA polimerasa: Enzima que cataliza la síntesis dependiente de molde de DNA a partir de

sus desoxirribonucleósidos 5′-trifosfatos precursores.

DNA quimera: DNA que contiene información genética procedente de dos especies diferentes.

DNA recombinante: DNA formado por la unión de genes dando nuevas combinaciones.

DNA relajado: Cualquier DNA que exista en su estructura más estable y sin tensiones, típicamente la forma B en la mayoría de condiciones celulares.

DNA satélite: Segmentos de DNA muy repetidos y no traducidos de los cromosomas eucarióticos; en la mayor parte de las ocasiones están asociados a la región centromérica. No está clara su función. También denominado DNA de secuencia sencilla.

DNA superenrollado: DNA que se tuerce sobre sí mismo debido a que está super- o subenrollado (y por consiguiente tensionado) en relación a la forma B del DNA.

doble hélice: Conformación plegada natural de dos cadenas de DNA antiparalelas complementarias.

dogma central: Principio organizativo de la biología molecular; la información fluye desde el DNA al RNA y a la proteína.

dominio: Unidad estructural distintiva de un polipéptido; los dominios pueden tener funciones separadas y se pueden plegar en unidades compactas independientes.

dominio SH2: Dominio proteico que se une fuertemente a un residuo fosfotirosina de ciertas proteínas tales como las tirosina quinasas de receptores, iniciando la formación de un complejo multiproteico que actúa en una ruta de señalización.

e

E'°: *Véase* potencial de reducción estándar.

***E. coli (Escherichia coli)*:** Bacteria común que se encuentra en el intestino delgado de los vertebrados; es el organismo mejor estudiado.

ecuación de Henderson-Hasselbalch: Ecuación que relaciona el pH, el pK_a y la razón de concentraciones de las especies aceptora de protones (A^-) y dadora de protones (HA) en una solución:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}.$$

ecuación de Lineweaver-Burk: Transformación algebraica de la ecuación de Michaelis-Menten, que permite la determinación de V_{max} y K_m por extrapolación de la [S] al infinito:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}.$$

ecuación de Michaelis-Menten: Ecuación que describe la dependencia hiperbólica de la velocidad inicial de reacción, V_0, en función de la concentración de sustrato [S], en muchas reacciones catalizadas por enzimas:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}.$$

edición del RNA: Modificación postranscripción de un mRNA que altera el significado de uno o más codones durante la traducción.

efecto hipercrómico: Gran incremento de la absorción de la luz a 260 nm que tiene lugar cuando se funde (despliega) un DNA de doble hélice.

electrófilo: Grupo deficiente en electrones con una fuerte tendencia a aceptar electrones a partir de un grupo rico en electrones (nucleófilo).

electroforesis: Movimiento de solutos cargados en respuesta a un campo eléctrico; se utiliza con frecuencia para separar mezclas de iones, proteínas o ácidos nucleicos.

electrogénico: Que contribuye a un potencial eléctrico a través de una membrana.

electroporación: Introducción de macromoléculas al interior de células después de haberlas hecho transitoriamente permeables por aplicación de un pulso de alto voltaje.

elemento de respuesta: Región del DNA, cerca de un gen (en el lado 5′) al que se han unido proteínas específicas que influyen en la velocidad de transcripción del gen.

elemento de respuesta a hormona (HRE): Pequeña secuencia de DNA (12 a 20 pb) a la que se unen los receptores de las hormonas esteroideas, tiroideas, retinoides y de la vitamina D, alterando la expresión de los genes contiguos. Para cada hormona existe una secuencia consenso preferida para el receptor afín.

eluato: Efluente de una columna de cromatografía.

enantiómeros: Estereoisómeros no superponibles que son imágenes especulares el uno del otro.

encaje inducido: Cambio en la conformación de un enzima en respuesta a la unión del sustrato que hace que el enzima sea catalíticamente activo; utilizado también para indicar cambios en la conformación de cualquier macromolécula en respuesta a la unión de ligando de tal modo que el sitio de unión en la macromolécula se adapta mejor a la forma del ligando.

endocitosis: Captación de material extracelular mediante su inclusión dentro de una vesícula (endosoma) formada por una invaginación de la membrana plasmática.

endonucleasa: Enzima que hidroliza los enlaces fosfodiéster interiores de un ácido nucleico; esto es, actúa en puntos que no son los enlaces terminales.

endonucleasas de restricción: Endodesoxirribonucleasas específicas de sitio que producen el corte de ambas hebras de DNA en puntos que están dentro o cerca del sitio específico reconocido por el enzima; herramientas importantes en la ingeniería genética.

energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$): Cantidad de energía (en julios) necesaria para convertir todas las moléculas en 1 mol de una sustancia reaccionante desde el basal al estado de transición.

energía de enlace: Energía requerida para romper un enlace.

energía de fijación (unión): Energía que proviene de las interacciones no covalentes entre enzima y sustrato o entre receptor y ligando.

energía libre (G): Componente de la energía total de un sistema que puede realizar trabajo a temperatura y presión constantes.

energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$): *Véase* energía de activación.

enfoque isoeléctrico: Método electroforético para separar macromoléculas en base a su pH isoeléctrico.

enlace covalente: Enlace químico en el que se comparten pares de electrones.

enlace de hidrógeno: Atracción electrostática débil entre un átomo electronegativo (tales como oxígeno o nitrógeno) y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un segundo átomo electronegativo.

enlace disulfuro: Enlace covalente formado por la unión oxidativa entre dos residuos Cys, de la misma o de diferentes cadenas polipeptídicas, formando un residuo cistina.

enlace fosfodiéster: Agrupamiento químico que contiene dos alcoholes esterificados a una molécula de ácido fosfórico que a su vez sirve de unión entre los mismos.

enlace peptídico: Enlace amida sustituido entre el grupo α-amino de un aminoácido y el grupo α-carboxilo de otro con eliminación de los elementos del agua.

enlaces glucosídicos: Enlaces entre un azúcar y otra molécula (típicamente un alcohol, purina, una pirimidina o un azúcar) a través de un átomo de oxígeno intermedio.

entalpía (H): Contenido calórico de un sistema.

entropía (S): Cantidad de desorden de un sistema.

enzima: Biomolécula, proteína o RNA, que cataliza una reacción química específica. No afecta al equilibrio de la reacción catalizada; aumenta la velocidad de reacción proporcionando una ruta de reacción con una energía de activación inferior.

enzima alostérico: Enzima regulador con actividad catalítica modulada por la unión no covalente de un metabolito específico a un sitio distinto del sitio activo.

enzima heterotrópico: Enzima alostérico que requiere un modulador que no sea el sustrato.

enzima homotrópico: Enzima alostérico que utiliza su sustrato como modulador.

enzima regulador: Enzima que tiene una función reguladora gracias a su capacidad de experimentar un cambio en su actividad catalítica por mecanismos alostéricos o por modificación covalente.

enzima reprimible: En bacterias, enzima cuya síntesis es inhibida cuando su producto de reacción es fácilmente asequible a la célula.

enzimas con dos actividades (moonlighting enzymes): Enzimas que tienen dos funciones distintas, de las cuales una al menos es catalítica; la otra puede ser catalítica, reguladora o estructural.

enzimas constitutivos: Enzimas requeridos en todo momento por una célula y presentes a un nivel constante; por ejemplo, muchos enzimas de las rutas metabólicas centrales.

epigenético: Describe cualquier característica heredada por un organismo vivo que se adquiere por medios en los que no interviene la secuencia de nucleótidos de los cromosomas parentales; por ejemplo, las modificaciones covalentes de las histonas.

epimerasas: Enzimas que catalizan la interconversión reversible de dos epímeros.

epímeros: Dos estereoisómeros que difieren en configuración en un centro asimétrico, en un compuesto que tiene dos o más centros asimétricos.

epitopo: Determinante antigénico; el grupo o grupos químicos concretos dentro de una macromolécula (antígeno) al que se une un determinado anticuerpo.

equilibrio: Estado de un sistema en el que no se produce más variación neta; la energía libre se encuentra en un mínimo.

equivalente de reducción: Término que describe un electrón o equivalente electrónico en forma de átomo de hidrógeno o de hidruro.

eritrocito: Célula que contiene grandes cantidades de hemoglobina y que está especializada en el transporte de oxígeno; glóbulo rojo de la sangre.

***Escherichia coli*:** *Véase E. coli.*

escramblasas: Proteínas de membrana que catalizan el movimiento de fosfolípidos a través de la bicapa de la membrana, que conduce a una distribución uniforme de un lípido entre las dos hojas de la membrana.

esfingolípido: Lípido anfipático con un esqueleto de esfingosina al que está unido un ácido graso de cadena larga y un alcohol polar.

especie reactiva de oxígeno (ROS): Productos muy reactivos procedentes de la reducción parcial de O_2, entre ellos el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido ($\cdot O_2^-$) y radical hidroxilo libre $\cdot OH$, producidos como productos secundarios minoritarios durante la fosforilación oxidativa.

especificidad: Capacidad de un enzima o receptor para discriminar entre sustratos o ligandos competitivos.

espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN): Técnica que utiliza ciertas propiedades de mecánica cuántica de núcleos atómicos para estudiar la estructura y dinámica de las moléculas de las que forman parte.

espliceosoma: Complejo de varios RNA y proteínas que intervienen en el corte y empalme de mRNA en células eucarióticas.

EST: *Véase* marca de secuencia expresada.

estado basal: Forma normal, estable de un átomo o molécula; contrario de estado excitado.

estado de transición: Forma activada de una molécula en la que la molécula ha experimentado una reacción química parcial; punto más elevado en la coordenada de reacción.

estado estacionario: Estado de no equilibrio de un sistema a través del cual fluye materia y en el que todos los componentes permanecen a concentración constante.

estado excitado: Estado rico en energía de un átomo o molécula; producido por la absorción de energía luminosa.

estereoisómeros: Compuestos que tienen la misma composición y el mismo orden de conexiones atómicas pero diferentes ordenamientos moleculares.

esteroles: Clase de lípidos que contienen el núcleo esteroide.

estroma: Espacio y solución acuosa recluida dentro de la membrana interna de un cloroplasto pero que no incluye el contenido en el interior de las membranas tilacoides.

estructura cuaternaria: Estructura tridimensional de una proteína con varias subunidades; en especial la forma en que se acoplan las unidades entre ellas.

estructura primaria: Descripción del armazón covalente de un polímero (macromolécula) que incluye la secuencia de las unidades monoméricas y todos los enlaces covalentes inter o intracatenarios.

estructura secundaria: Ordenamiento espacial local de los átomos principales en un segmento de una cadena polipeptídica; también se aplica a la estructura de un polinucleótido.

estructura supersecundaria: *Véase* motivo.

estructura terciaria: Conformación tridimensional de un polímero en su estado plegado nativo.

eucariota: Organismo uni- o multicelular con células que tienen un núcleo rodeado por membrana, múltiples cromosomas y orgánulos internos.

eucromatina: Regiones de los cromosomas en interfase que se tiñen difusamente, en contraposición con la heterocromatina más condensada que se tiñe fuertemente. A menudo son regiones en las que los genes se están expresando activamente.

exocitosis: Fusión de una vesícula intracelular con la membrana plasmática con liberación de los contenidos de la vesícula al espacio extracelular.

exón: Segmento de un gen eucariótico que codifica una porción del producto final de un gen; porción de RNA que permanece después de la maduración postranscripción y que se transcribe en proteína o se incorpora a la estructura de un RNA. *Véase también* intrón.

exonucleasa: Enzima que sólo hidroliza los enlaces fosfodiéster que están en las posiciones terminales de un ácido nucleico.

expresion génica: Transcripción y, en el caso de las proteínas, traducción que da lugar al producto de un gen; un gen se expresa cuando su producto biológico se halla presente y es activo.

extrahepático: Término utilizado para referirse a los tejidos fuera del hígado; implica la centralidad del hígado en el metabolismo.

extremo 3′: Extremo de un ácido nucleico que carece de nucleótido unido a la posición 3′ del residuo terminal.

extremo 5′: Extremo de un ácido nucleico que carece de nucleótido unido a la posición 5′ del residuo terminal.

extremo reductor: Extremo de un polisacárido con un azúcar terminal que tiene un carbono anomérico libre; el residuo terminal puede actuar como un azúcar reductor.

extremo terminal del cebador: Extremo del cebador al que se añaden las subunidades monoméricas.

extremos adhesivos: Dos extremos de DNA en la misma molécula de DNA, o en diferentes moléculas, con cortos segmentos salientes de cadena sencilla que son complementarios entre sí y que facilitan la ligación de los extremos; también se conocen como extremos cohesivos.

extremos cohesivos: *Véase* extremos adhesivos.

f

factor de transcripción: En los eucariotas, proteína que afecta la regulación y el inicio de la transcripción de un gen al unirse a una secuencia reguladora cerca o dentro del gen e interaccionar con la RNA polimerasa y/u otros factores de transcripción.

factores de crecimiento: Proteínas u otras moléculas que actúan desde el exterior de una célula para estimular el crecimiento y la división celulares.

factores de extensión (elongación): (1) Proteínas que funcionan en la fase de extensión, o alargamiento, de la transcripción eucariótica. (2) Proteínas específicas requeridas en la extensión (alargamiento) de cadenas polipeptídicas por los ribosomas.

factores de liberación: Factores proteicos del citosol necesarios en la liberación desde el ribosoma de una cadena polipeptídica completa; también se conocen como factores de terminación.

factores de terminación: *Véase* factores de liberación.

factores liberadores: Hormonas hipotalámicas que estimulan la liberación de otras hormonas por la hipófisis.

FAD (flavina adenina dinucleótido): Coenzima de algunos enzimas de oxidación-reducción; contiene riboflavina.

fago: *Véase* bacteriófago.

fago temperado: Fago cuyo DNA se puede incorporar en el genoma de la célula huésped sin ser expresado; en contraposición con un fago virulento que destruye la célula huésped.

fenotipo: Características observables de un organismo.

fermentación: Degradación anaeróbica productora de energía de una molécula de nutriente, como la glucosa, sin oxidación neta; da lugar a lactato, etanol u otros productos.

fermentación alcohólica: *Véase* fermentación etanólica.

fermentación etanólica: Conversión anaeróbica de glucosa en etanol vía glucólisis. También llamada fermentación alcohólica. *Véase* fermentación.

ferredoxina: Proteína ferro-sulfurada (2Fe-2S) de los cloroplastos que transporta electrones desde centros ferro-sulfurados asociados con el fotosistema I al $NADP^+$ durante la fotofosforilación.

fibroblasto: Célula del tejido conjuntivo que secreta proteínas del tejido conjuntivo tales como el colágeno.

fijación de nitrógeno: Conversión de nitrógeno atmosférico (N_2) en una forma reducida biológicamente asequible mediante microorganismos fijadores de nitrógeno.

filtración en gel: *Véase* cromatografía por exclusión de tamaño.

fingerprinting: *Véase* mapas peptídicos.

flagelo: Apéndice celular utilizado en la propulsión. Los flagelos bacterianos tienen una estructura mucho más sencilla que los flagelos eucarióticos, que son similares a los cilios.

flavina adenina dinucleótido: *Véase* FAD.

flavina mononucleótido: *Véase* FMN.

flavoproteína: Enzima que contiene un nucleótido de flavina en forma de grupo prostético fuertemente unido.

flipasas: Proteínas de membrana de la familia de transportadores ABC que catalizan el movimiento de fosfolípidos desde la cara extracelular a la cara citosólica de una bicapa de membrana.

flopasas: Proteínas de membranas de la familia de los transportadores ABC que cataliza el movimiento de fosfolípidos desde la cara citosólica a la extracelular de la bicapa de una membrana.

flujo electrónico cíclico: En los cloroplastos, el flujo de electrones inducido por la luz que se origina y vuelve al fotosistema I.

flujo electrónico no cíclico: Flujo de electrones inducido por la luz desde el agua hasta el $NADP^+$ en la fotosíntesis con desprendimiento de oxígeno; intervienen tanto el fotosistema I como el II.

fluorescencia: Emisión de luz por moléculas excitadas que retornan al estado basal.

FMN (flavina mononucleótido): Riboflavina fosfato, coenzima de ciertos enzimas de oxidación-reducción.

forma replicativa: Cualquiera de las formas estructurales de longitud completa de un cromosoma vírico que sirven como intermediarios de replicación definidos.

formación de lazos del DNA: Interacción de proteínas en sitios distantes de una molécula de DNA de modo que el DNA interpuesto forma un bucle.

fórmulas de proyección: Método para representar moléculas que muestra la configuración de grupos alrededor de centros quirales; también se conocen como fórmulas de proyección de Fischer.

fórmulas de proyección de Fischer: *Véase* fórmulas de proyección.

fórmulas en perspectiva de Haworth: Método para representar estructuras químicas cíclicas de modo que definan la configuración de cada grupo sustituyente; es el método más utilizado para representar azúcares.

fosfatasas: Enzimas que hidrolizan un éster o anhídrido fosfato, liberando fosfato inorgánico, P_i.

fosfolípido: Lípido que contiene uno o más grupos fosfato.

fosforilación: Formación de un derivado fosfato de una molécula, normalmente por transferencia de un grupo fosfato desde el ATP.

fosforilación a nivel de sustrato: Fosforilación del ADP o algún otro nucleósido 5′-difosfato acoplada a la deshidrogenación de un sustrato orgánico; independiente de la cadena de transporte electrónico.

fosforilación ligada a la respiración: Formación de ATP a partir de ADP y P_i impulsada por el flujo electrónico a través de una serie de transportadores ligados a membrana, con un gradiente de protones como fuente directa de energía que impulsa la catálisis rotacional por la ATP sintasa.

fosforilación fotosintética: *Véase* fotofosforilación.

fosforilación oxidativa: Fosforilación enzimática del ADP a ATP acoplada a la transferencia de electrones desde un sustrato al oxígeno molecular.

fosforilasas: Enzimas que catalizan una fosforólisis.

fosforólisis: Rotura de un compuesto con fosfato como grupo atacante; análoga a la hidrólisis.

fotofosforilación: Formación enzimática de ATP a partir del ADP acoplada a la transferencia de electrones dependiente de la luz en las células fotosintéticas.

fotofosforilación cíclica: Síntesis de ATP impulsada por el flujo electrónico cíclico a través del fotosistema I.

fotón: Unidad básica (cuanto) de energía luminosa.

fotorreducción: Reducción inducida por la luz de un aceptor electrónico en las células fotosintéticas.

fotorrespiración: Consumo de oxígeno que tiene lugar en plantas de zonas templadas iluminadas, debido en su mayor parte a la oxidación de fosfoglicolato.

fotosíntesis: Utilización de la energía luminosa para producir glúcidos a partir de dióxido de carbono y un agente reductor tal como el agua.

fotosistema: En la células fotosintéticas, conjunto funcional de pigmentos que absorben la luz y su centro de reacción.

fotótrofo: Organismo que puede utilizar la energía de la luz para sintetizar sus propios combustibles a partir de moléculas sencillas tales como dióxido de carbono, oxígeno y agua; en contraposición a quimiótrofo.

fracción: Porción de una muestra biológica que se ha sometido a un proceso diseñado para la separación de macromoléculas basado en una propiedad tal como la solubilidad, la carga neta, la masa molecular o la función.

fraccionamiento: Proceso de separar las proteínas u otros componentes de una mezcla molecular compleja en fracciones basadas en diferencias de sus propiedades físicas, tales como solubilidad carga neta, masa molecular o función.

fragmento de restricción: Segmento de DNA de doble cadena producido por la acción de una endonucleasa de restricción sobre un DNA mayor.

FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching; recuperación de la fluorescencia después de la fotodecoloración): Técnica utilizada para cuantificar la difusión de componentes de la membrana (lípidos o proteínas) en el plano de la bicapa.

fuerza protón-motriz: Potencial electroquímico inherente en un gradiente transmembrana de concentración de H^+; utilizada en la fosforilación oxidativa y en la fotofosforilación para impulsar la síntesis de ATP.

fuerzas de London: Fuerzas débiles, temporales, de atracción entre moléculas que inducen dipolos en cada una de ellas.

furanosa: Glúcido sencillo que contiene el anillo de cinco átomos furano.

g

$\Delta G'^\circ$: *Véase* variación de energía libre estándar.

gametos: Células reproductoras con un contenido génico haploide; células espermáticas u óvulos.

gangliósidos: Esfingolípidos que contienen oligosacáridos complejos como grupos de cabeza; especialmente abundantes en el tejido nervioso.

gen: Segmento de un cromosoma que codifica una sola cadena polipeptídica funcional o molécula de RNA.

gen estructural: Gen que codifica una proteína o molécula de RNA; en contraposición a gen regulador.

gen regulador: Gen que da lugar a un producto implicado en la regulación de la expresión de otro gen; por ejemplo, un gen que codifica una proteína represora.

gen supresor de tumores: Elemento de una clase de genes que codifican proteínas que normalmente suprimen la división de las células. Cuando es defectuoso, el gen normal se convierte en gen supresor de tumores y cuando ambas copias son defectuosas la célula puede continuar dividiéndose sin límite; se transforma en una célula tumoral.

genes homeóticos: Genes que regulan el desarrollo del patrón de segmentos en el plan corporal de *Drosophila melanogaster*; se encuentran genes similares en muchos vertebrados.

genoma: Toda la información genética en forma codificada contenida en una célula o virus.

genómica: Ciencia dedicada en sentido amplio al conocimiento y comprensión de los genomas celulares y de organismos.

genoteca: Colección de fragmentos clonados de DNA.

genoteca de cDNA: Genoteca que consiste enteramente de cDNA clonados de un organismo o tipo celular determinados.

genotipo: Constitución genética de un organismo a diferencia de sus características físicas, o fenotipo.

GFP: *Véase* proteína fluorescente verde.

giro β: Tipo de estructura secundaria en proteínas que consta de cuatro residuos aminoácidos dispuestos en un giro cerrado de manera que el polipéptido se dobla sobre sí mismo.

glándulas endocrinas: Grupos de células especializadas en la síntesis de hormonas que secretan a la sangre para regular otros tipos de células.

glicerofosfolípido: Lípido anfipático con un esqueleto de glicerol; los ácidos grasos están unidos en enlace éster al C-1 y C-2 del glicerol mientras que un alcohol polar está unido mediante enlace fosfodiéster al C-3.

glioxisoma: Peroxisoma especializado que contiene los enzimas del ciclo del glioxilato; están en células de semillas en germinación.

glucano: Otro nombre para polisacárido; polímero de unidades monosacáridas unidas por enlaces glucosídicos.

glucoconjugado: Compuesto que contiene un componente glucídico unido covalentemente a una proteína o lípido, formando una glucoproteína o glucolípido.

glucogénesis: Proceso de conversión de la glucosa en glucógeno.

glucogenina: Proteína que ceba la síntesis de nuevas cadenas de glucógeno y al mismo tiempo cataliza la polimerización de los primeros residuos de azúcar de cada cadena antes que la glucógeno sintasa continúe la extensión.

glucogenólisis: Degradación enzimática del glucógeno almacenado (no el de la dieta).

glucolípido: Lípido que contiene un grupo glucídico.

glucólisis: Ruta catabólica mediante la que se rompe una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato.

glucómica: Caracterización sistemática de todos los componentes glucídicos de una célula o tejido, incluidos los que están unidos covalentemente a una proteína o lípido.

gluconeogénesis: Biosíntesis de un glúcido a partir de precursores más sencillos no glucídicos tales como el oxalacetato o el piruvato.

glucoproteína: Proteína que contiene un grupo glucídico.

glucosaminoglucano: Heteropolisacárido de dos unidades alternantes: una es *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina; la otra es un ácido urónico (normalmente ácido glucurónico). Antes se conocía como mucopolisacárido.

GLUT: Designación de una familia de proteínas de membrana que transportan glucosa.

gradiente electroquímico: Suma de los gradientes de concentración y de carga eléctrica de un ión a través de una membrana; fuerza impulsora de la fosforilación oxidativa y de la fotofosforilación.

gráfica de dobles recíprocos: Gráfica de $1/V_o$ frente a $1/[S]$, que permite una determinación más precisa de V_{max} y K_m que una gráfica de V_o frente a [S]; también se denomina gráfica de Lineweaver-Burk.

grana: Pilas de tilacoides, sacos o discos membranosos aplanados, en los cloroplastos.

grupo funcional: Átomo o grupo de átomos específicos que confieren una propiedad química particular a una biomolécula.

grupo prostético: Ión metálico o compuesto orgánico (diferente de un aminoácido) que está unido covalentemente a una proteína siendo esencial para su actividad.

grupo R: (1) Formalmente, abreviatura que denota un grupo alquilo. (2) Ocasionalmente, utilizado en un sentido más general para denotar virtualmente cualquier sustituyente orgánico (grupos R de aminoácidos, por ejemplo).

grupo saliente: Grupo molecular que sale o es desplazado en una eliminación unimolecular o en una reacción de sustitución bimolecular.

h

haploide: Que tiene un solo conjunto de información genética; describe una célula con un cromosoma de cada tipo. *Compárese* con diploide.

hapteno: Pequeña molécula que, ligada a una molécula mayor, provoca una respuesta inmune.

hebra conductora: Hebra de DNA que, durante la replicación, se sintetiza en la misma dirección que el movimiento de la horquilla de replicación.

hebra molde: Hebra de ácido nucleico utilizada por una polimerasa como molde para sintetizar una hebra complementaria.

hebra rezagada: Hebra de DNA que durante la replicación ha de ser sintetizada en la dirección opuesta a la del movimiento de la horquilla de replicación.

helicasa: Enzima que cataliza la separación de cadenas en una molécula de DNA antes de su replicación.

hélice: *Véase* hélice α; doble hélice.

hélice α: Conformación helicoidal de una cadena polipeptídica, normalmente a derechas (dextrógira), en la que se produce la máxima formación de puentes de hidrógeno intracatenarios; es una de las estructuras secundarias más frecuentes en las proteínas.

hemo: Grupo prostético de hierro-porfirina de las proteínas con hemo.

hemoglobina: Proteína con hemo de los eritrocitos; actúa en el transporte de O_2.

hemoproteína: Proteína que contiene hemo como grupo prostético.

heparán sulfato (sulfato de heparán): Polímero sulfatado con residuos alternantes de *N*-acetilglucosamina y ácido glucónico o irudónico; se encuentra de manera típica en la matriz extracelular.

hepatocito: Principal tipo de célula del tejido hepático.

heteropolisacárido: Polisacárido que contiene más de un tipo de azúcar.

heterótrofo: Organismo que requiere moléculas complejas de nutriente, tales como glucosa, como fuente de energía y de carbono.

heterotrópico: Describe un modulador alostérico distinto del ligando normal.

hexosa: Azúcar sencillo con un esqueleto que contiene seis átomos de carbono.

hialuronano: Polisacárido ácido de elevada masa molecular compuesto del disacárido alternante GlcUA($b1\rightarrow3$)GlcNAc. Es un componente mayoritario de la matriz extracelular y forma compuestos mayores (proteoglucanos) con proteínas y otros polisacáridos ácidos. También denominado ácido hialurónico.

hidrofílico: Polar o cargado; describe moléculas o grupos que se asocian con el agua (disolviéndose fácilmente en ella).

hidrofóbico: Apolar; describe moléculas o grupos que son insolubles en agua.

hidrolasas: Enzimas (proteasas, lipasas, fosfatasas, nucleasas, por ejemplo) que catalizan reacciones de hidrólisis.

hidrólisis: Rotura de un enlace, tal como un enlace anhídrido o peptídico, por adición de los elementos del agua dando dos o más productos.

hipoxia: Condición metabólica en la que el suministro de oxígeno está limitado gravemente.

histonas: Familia de proteínas básicas que se asocian fuertemente con el DNA en los cromosomas de todas las células eucarióticas.

hoja plegada: Ordenamiento lateral por puente de hidrógeno de cadenas polipeptídicas en la conformación β extendida.

holoenzima: Enzima catalíticamente activo que incluye todas las subunidades, grupos prostéticos y cofactores necesarios.

homeodominio: Dominio proteico codificado por la homeosecuencia; unidad reguladora que determina la segmentación de un plan corporal.

homeosecuencia: Secuencia conservada de DNA de 180 pares de bases que codifican un dominio proteico encontrado en muchas proteínas que tienen un papel regulador en el desarrollo.

homeostasis: Mantenimiento de un estado estacionario dinámico mediante mecanismos reguladores que compensan los cambios en las circunstancias externas.

homopolisacárido: Polisacárido formado por un solo tipo de unidad monosacárida.

homotrópico: Describe un modulador alostérico idéntico al ligando normal.

hormona: Sustancia química sintetizada en pequeñas cantidades por un tejido endocrino y que se transporta por la sangre a otro tejido en donde actúa como mensajero para regular la función del tejido u órgano diana.

hormona trópica (tropina): Hormona peptídica que estimula una glándula diana específica para que secrete su hormona; por ejemplo, la tirotropina producida por la hipófisis estimula la secreción de tiroxina por el tiroides.

horquilla: Estructura secundaria en el RNA o DNA de cadena sencilla en la que partes complementarias de una repetición palindrómica se pliegan y aparean formando una doble hélice antiparalela cerrada por un extremo.

horquilla de replicación: Estructura en forma de Y encontrada generalmente en el punto en que se está sintetizando el DNA.

HPLC: *Véase* cromatografía líquida de alta resolución.

HRE: *Véase* elemento de respuesta hormonal.

i

in situ: "En posición"; es decir en su posición o localización natural.

in vitro: En el tubo de ensayo.

in vivo: En la célula viva o en el organismo.

inactivador suicida: Molécula relativamente inerte que es transformada por un enzima en su sitio activo dando una sustancia reactiva que inactiva irreversiblemente el enzima.

índice hidropático: Escala que expresa las tendencias hidrofóbica e hidrofílica relativas de un grupo químico.

inducción: Incremento en la expresión de un gen en respuesta a un cambio en la actividad de una proteína reguladora.

inductor: Molécula señal que cuando se une a una proteína reguladora produce un aumento en la expresión de un gen determinado.

información genética: Información hereditaria contenida en una secuencia de bases de nucleótidos en el DNA cromosómico o en el RNA.

inhibición acompetitiva: Patrón de inhibición reversible que tiene lugar cuando una molécula de inhibidor puede unirse al complejo enzima-sustrato pero no al enzima libre.

inhibición competitiva: Tipo de inhibición enzimática que se puede revertir aumentando la concentración de sustrato; un inhibidor competitivo generalmente compite con el sustrato o ligando normal por el sitio de fijación en la proteína.

inhibición mixta: Patrón de inhibición reversible que se produce cuando una molécula de inhibidor se une al enzima libre o al complejo enzima-sustrato (no necesariamente con la misma afinidad).

inhibición por producto final: *Véase* retroinhibición.

inhibición reversible: Inhibición por una molécula que se une reversiblemente al enzima, de tal modo que se recupera la actividad enzimática cuanto el inhibidor ya no está presente.

inmunoglobulina: Proteína anticuerpo generada contra un antígeno y capaz de fijarse específicamente al mismo.

integrina: Miembro de una gran familia de proteínas transmembrana heterodiméricas que intervienen en la adhesión de células a otras células o a la matriz extracelular.

intensificadores (enhancers): Secuencias de DNA que facilitan la expresión de un gen dado; pueden estar situados a unos centenares, o incluso millares, de pares de bases del gen.

interacción de van der Waals: Fuerzas intermoleculares débiles entre moléculas resultado de la inducción de la polarización de una por la otra.

interacciones hidrofóbicas: Asociación de grupos, o compuestos, apolares entre sí en sistemas acuosos impulsados por la tendencia de las moléculas de agua circundantes a buscar su estado más estable (desordenado).

intercalado: Inserción entre dos anillos aromáticos o planos apilados; por ejemplo, inserción de una molécula plana entre dos bases sucesivas en un ácido nucleico.

interferones: Clase de glucoproteínas con actividad antivírica.

intermediario común: Compuesto químico común a dos reacciones químicas, como producto de una y reactivo de la otra.

intermediario de Holliday: Intermediario de la recombinación genética en el que dos moléculas de DNA de doble cadena se unen mediante un entrecruzamiento recíproco en el que interviene una hebra de cada molécula.

intermedio de reacción: Cualquier especie química en una ruta de reacción que tiene una duración química finita.

intrón: Secuencia de nucleótidos en un gen que se transcribe pero que se elimina por corte antes de la traducción del gen; también llamado secuencia interpuesta. *Véase también* exón.

ión hidronio: Ión hidrógeno hidratado (H_3O^+).

ionóforo: Compuesto que fija uno o varios iones metálicos y que puede difundir a través de una membrana transportando el ión unido.

isoenzimas: *Véase* isozimas.

isomerasas: Enzimas que catalizan la transformación de compuestos en sus isómeros posicionales.

isómero dextrógiro: Estereoisómero que gira el plano de la luz polarizada en el sentido de las agujas del reloj.

isómero levógiro: Estereoisómero que gira el plano de la luz polarizada en sentido contrario a las agujas del reloj.

isómeros: Dos moléculas cualesquiera con la misma fórmula molecular pero con diferente ordenamiento de grupos moleculares.

isómeros *cis* y *trans*: *Véase* isómeros geométricos.

isómeros geométricos: Isómeros relacionados por rotación alrededor de un doble enlace; también se denominan isómeros *cis* y *trans*.

isopreno: El hidrocarburo 2-metil-1,3-butadieno, unidad repetitiva de las biomoléculas terpenoides.

isoprenoide: Cualquiera de un gran número de productos naturales sintetizados por polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno; también llamados terpenoides.

isotérmico: Que tiene lugar a temperatura constante.

isótopo radiactivo: Forma isotópica de un elemento con un núcleo inestable que se autoestabiliza emitiendo radiación ionizante.

isótopos: Formas estables o radiactivas de un elemento que difieren en masa atómica pero que por lo demás son químicamente idénticas a la forma naturalmente más abundante del elemento; se utilizan como marcadores.

isozimas: Múltiples formas de un enzima que catalizan la misma reacción pero que difieren unas de otras en su secuencia de aminoácidos, afinidad por el sustrato, V_{max} y/o propiedades reguladoras; también se denominan isoenzimas.

l

lanzadera de la carnitina: Mecanismo para transportar ácidos grasos desde el citosol a la matriz mitocondrial en forma de ésteres grasos de la carnitina.

lectina: Proteína que se une a un glúcido, normalmente un oligosacárido, con una afinidad y especificidad muy elevadas, facilitando interacciones intercelulares.

leucocito: Célula blanca sanguínea; interviene en la respuesta inmune de los mamíferos.

leucotrienos: Familia de moléculas derivadas del araquidonato; contractores musculares que constriñen las vías aéreas en los pulmones y que están implicados en el asma.

ley de acción de masas: Ley que establece que la velocidad de cualquier reacción química es proporcional al producto de las actividades (o concentraciones) de los reactivos.

liasas: Enzimas que catalizan la eliminación de un grupo de una molécula formando un doble enlace, o la adición de un grupo a un doble enlace.

ligando: Pequeña molécula que se une específicamente a otra mayor; por ejemplo, una hormona es el ligando de su receptor proteico específico.

ligasas: Enzimas que catalizan reacciones de condensación en las que se unen dos átomos utilizando la energía del ATP u otro compuesto rico en energía.

linfocito B (célula B): Elemento de una clase de células sanguíneas (linfocitos), responsable de la producción de anticuerpos circulantes.

linfocito T (célula T): Elemento de una clase de células sanguíneas (linfocitos) de origen tímico implicadas en las reacciones inmunes celulares.

linfocitos: Subclase de leucocitos que intervienen en la respuesta inmune. *Véase también* linfocito B; linfocito T.

lipasas: Enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles.

lípido: Pequeña biomolécula insoluble en agua que generalmente contiene ácidos grasos, esteroles o compuestos isoprenoides.

lipidoma: Complemento total de lípidos en una célula o tejido en un conjunto dado de condiciones.

lipoato (ácido lipoico): Vitamina para algunos microorganismos; transportador intermediario de átomos de hidrógeno y grupos acilo en las α-cetoácido deshidrogenasas.

lipoproteína: Agregado de lípido-proteína que sirve para transportar en la sangre lípidos insolubles en agua. El componente proteico solo es una apolipoproteína.

liposoma: Vesícula esférica pequeña compuesta de una bicapa fosfolipídica, que se forma espontáneamente cuando se suspenden fosfolípidos en un tampón acuoso.

lisis: Destrucción de la membrana plasmática de una célula o de una pared celular bacteriana liberando el contenido celular y matando a la célula.

lisosoma: Orgánulo rodeado por una membrana que se encuentra en el citoplasma de células eucarióticas; contiene muchos enzimas hidrolíticos y actúa como un centro de degradación y reciclado de componentes que ya no se necesitan.

longitud de contorno: Longitud de un polímero helicoidal medida a lo largo del eje de la molécula helicoidal.

m

macromolécula: Molécula que tiene una masa molecular en el intervalo de unos cuantos millares a muchos millones.

macromoléculas portadoras de información: Biomoléculas que contienen información en forma de secuencias específicas de diferentes monómeros; por ejemplo, muchas proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos.

maduración postranscripción: Modificación enzimática del transcrito de RNA primario produciendo moléculas de RNA maduras, entre las que se incluyen los mRNA, tRNA, rRNA y muchas otras clases de RNA.

mapa genético: Diagrama que muestra la secuencia y posición relativas de genes específicos a lo largo de un cromosoma.

mapas peptídicos: Patrón bidimensional (sobre papel o gel) característico constituido por la separación de una mezcla de péptidos formados como consecuencia de la hidrólisis parcial de una proteína. También se denomina fingerprinting de péptidos.

marca de epítopo: Secuencia o dominio proteico unida a un anticuerpo bien caracterizado.

marca de secuencia expresada (expressed sequence tag, EST): Un tipo específico de sitio en el DNA con secuencia marcada que representa un gen que se expresa.

marco de lectura: Conjunto de codones de tres nucleótidos en el DNA o RNA que son contiguos y no se solapan. También se denomina pauta de lectura.

marco de lectura abierto: Grupo de codones nucleotídicos continuos sin solapamiento en una molécula de DNA o RNA que no incluye codón de terminación.

masa molecular gramo: Masa en gramos de un compuesto que es numéricamente igual a su masa molecular; la masa de un mol.

matriz: Contenido acuoso de una célula u orgánulo (la mitocondria, por ejemplo) con solutos disueltos.

matriz extracelular: Combinación entretejida de glucosaminoglucanos, proteoglucanos y proteínas, inmediatamente en el exterior de la membrana plasmática y que proporciona anclaje celular, reconocimiento posicional y tracción durante la migración celular.

meiosis: Tipo de división celular en la que células diploides dan lugar a células haploides destinadas a convertirse en gametos.

membrana plasmática: Membrana exterior que rodea el citoplasma de una célula.

metabolismo: Conjunto completo de transformaciones catalizadas por enzimas de moléculas orgánicas en las células vivas; suma del anabolismo y catabolismo.

metabolismo basal: Velocidad de consumo de oxígeno por el cuerpo de un animal en completo reposo y mucho tiempo después de una comida.

metabolismo intermediario: En las células, las reacciones catalizadas enzimáticamente que extraen energía química a partir de moléculas nutrientes utilizándola para sintetizar y unir componentes celulares.

metabolismo secundario: Rutas que conducen a productos especializados que no se encuentran en todas las células vivas.

metabolismo vectorial: Transformaciones metabólicas en las que la localización (no la composición química) de un sustrato cambia en relación a la membrana plasmática o una membrana celular que divide dos compartimientos. Los transportadores catalizan reacciones vectoriales, lo mismo que las bombas de protones de la fosforilación oxidativa y de la fotofosforilación.

metabolito: Intermediario químico en las reacciones del metabolismo catalizadas por enzimas.

metaboloma: Conjunto completo de metabolitos de pequeño tamaño (intermediarios metabólicos, señales, metabolitos secundarios) presentes en una célula o tejidos determinados en condiciones específicas.

metabolón: Conjunto supramolecular de enzimas metabólicos secuenciales.

metaloproteína: Proteína que tiene un ión metálico como grupo prostético.

metamerismo: División del cuerpo en segmentos; en los insectos, por ejemplo.

mezcla racémica (racemato): Mezcla equimolar de los estereoisómeros D y L de un compuesto ópticamente activo.

micela: Agregado de moléculas anfipáticas en agua con las porciones apolares en el interior y las porciones polares en la superficie exterior expuestas al agua.

microchip de DNA: Colección de secuencias de DNA inmovilizadas sobre una superficie sólida, con las secuencias individuales presentadas en ordenamientos según patrones, que pueden analizarse con sondas para su hibridación.

microcuerpos: Vesículas citoplasmáticas envueltas por membrana que contienen enzimas formadores y destructores de peróxido; incluyen lisosomas, peroxisomas y glioxisomas.

microfilamentos: Filamentos delgados compuestos de actina que se encuentran en el citoplasma de células eucarióticas; tienen misiones estructurales y para el movimiento.

micro-RNA: *Véase* miRNA.

microsomas: Vesículas membranosas formadas por fragmentación del retículo endoplasmático de las células eucarióticas; se recuperan mediante centrifugación diferencial.

microtúbulos: Túbulos delgados formados a partir de dos tipos de subunidades de tubulina globular; presentes en cilios, flagelos, centrosomas y otras estructuras contráctiles o motiles.

migración de la ramificación: Movimiento del punto de ramificación en un DNA ramificado formado a partir de dos moléculas de DNA con secuencias idénticas. *Véase también* intermediario de Holliday.

miocito: Célula muscular.

miofibrilla: Unidad de filamentos gruesos y delgados de las fibras musculares.

miosina: Proteína contráctil; principal componente de los filamentos gruesos del músculo y de otros sistemas actina-miosina.

miRNA (micro-RNA): Clase de moléculas de RNA pequeñas (20 a 25 nucleótidos después de finalizada la maduración) que intervienen en el silenciamiento de genes mediante inhibición de la traducción y/o promoción de la degradación de mRNA concretos.

mitocondria: Orgánulo rodeado de membrana en el citoplasma de células eucarióticas; contiene los sistemas enzimáticos requeridos para el ciclo del ácido cítrico, la oxidación de ácidos grasos, la transferencia electrónica y la fosforilación oxidativa.

mitosis: Proceso en múltiples pasos en las células eucarióticas que da como resultado la replicación de cromosomas y la división celular.

modelo del mosaico fluido: Modelo que describe las membranas biológicas como una

bicapa lipídica fluida en la que hay proteínas incrustadas; la bicapa tiene asimetría tanto estructural como funcional.

modificación postraducción: Modificación enzimática de una cadena polipeptídica después de la traducción a partir de su mRNA.

modulador: Metabolito que cuando se une a un sitio alostérico de un enzima altera sus características cinéticas.

mol: Una masa molecular gramo de un compuesto. *Véase también* número de Avogadro.

molde: Matriz o patrón macromolecular para la síntesis de una macromolécula portadora de información.

molécula proquiral: Molécula simétrica que puede reaccionar asimétricamente con un enzima que tiene un sitio activo asimétrico, generando un producto quiral.

monocapa: Capa sencilla de moléculas lipídicas orientadas.

monosacárido: Glúcido formado por una sola unidad de azúcar.

motivo: Patrón de plegado característico de elementos de estructura secundaria observado en una o más proteínas. Un motivo puede ser simple o complejo y puede representar una cadena polipeptídica completa o sólo una parte de la misma. También se denomina pliegue o estructura supersecundaria.

mRNA: *Véase* RNA mensajero.

mRNA monocistrónico: Un mRNA que se traduce en una sola proteína.

mRNA policistrónico: Un mRNA contiguo con más de dos genes que pueden traducirse a proteínas.

mucopolisacárido *Véase* glucosaminoglucano.

mutación: Cambio heredable en la secuencia nucleotídica de un cromosoma.

mutación de inserción: Mutación producida por la inserción de una o varias bases extra, o un mutágeno, entre dos bases sucesivas en el DNA.

mutación de sustitución: Mutación causada por la sustitución de una base por otra.

mutación letal: Mutación que inactiva una función biológica esencial para la vida de la célula o del organismo.

mutación por deleción: Mutación resultado de la deleción de uno o más nucleótidos de un gen o cromosoma.

mutación silenciosa: Mutación en un gen que no produce un cambio detectable en las características biológicas del producto génico.

mutación sin sentido: Mutación que produce la terminación prematura de una cadena polipeptídica.

mutación supresora: Mutación que restaura total o parcialmente una función perdida por una mutación primaria; localizada en un sitio diferente del de la mutación primaria.

mutagénesis dirigida: Conjunto de métodos utilizados para crear alteraciones específicas en la secuencia de un gen.

mutágeno intercalante: Mutágeno que se inserta entre dos bases sucesivas de un ácido nucleico produciendo una mutación de desplazamiento de marco de lectura.

mutante auxotrófico (auxótrofo): Organismo mutante defectivo en la síntesis de una biomolécula determinada que, por lo tanto, se le ha de suministrar para su crecimiento.

mutante residual: Gen mutante que da lugar a un producto con un nivel detectable de actividad biológica.

mutarrotación: Variación en la rotación específica de un azúcar o glucósido de piranosa o furanosa que acompaña el equilibrio de sus formas anoméricas α y β.

mutasas: Enzimas que catalizan la transposición de grupos funcionales.

n

NAD, NADP (nicotinamida adenina dinucleótido, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato): Los coenzimas que contienen nicotinamida funcionan como transportadores de átomos de hidrógeno y electrones en algunas reacciones de oxidación-reducción.

ncRNA (RNA no codificante): Cualquier RNA que no contiene instrucciones para un producto proteico.

neurona: Célula del tejido nervioso especializada en la transmisión de un impulso nervioso.

neurotransmisor: Compuesto de baja masa molecular (normalmente contiene nitrógeno) secretado en el axón terminal de una neurona y fijado por un receptor específico en la siguiente neurona; transmite el impulso nervioso.

nicotinamida adenina dinucleótido, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato: *Véase* NAD, NADP.

nucleasas: Enzimas que hidrolizan los enlaces internucleotídicos (fosfodiéster) de los ácidos nucleicos.

núcleo: En los eucariotas, orgánulo rodeado por una membrana que contiene los cromosomas.

nucleófilo: Grupo rico en electrones con una fuerte tendencia a donar electrones a un núcleo deficitario en electrones (electrófilo); reactivo entrante en una reacción de sustitución bimolecular.

nucleoide: En las bacterias la zona nuclear que contiene el cromosoma pero que no tiene membrana que lo rodee.

nucleolo: Estructura densamente teñida en el núcleo de células eucarióticas; interviene en la síntesis de rRNA y en la formación de ribosomas.

nucleoplasma: Porción del contenido de una célula eucariótica dentro de la membrana nuclear; también se denomina matriz nuclear.

nucleósido: Compuesto formado por una base púrica o pirimidínica unida covalentemente a una pentosa.

nucleósido difosfato azúcar: Transportador de tipo coenzimático de una molécula de azúcar que funciona en la síntesis enzimática de polisacáridos y derivados de azúcares.

nucleósido difosfato quinasa: Enzima que cataliza la transferencia del fosfato terminal de un nucleósido 5′-trifosfato a un nucleósido 5′-difosfato.

nucleósido monofosfato quinasa: Enzima que cataliza la transferencia del fosfato terminal del ATP a un nucleósido 5′-monofosfato.

nucleosoma: Unidad estructural del empaquetamiento de la cromatina de eucariotas; consiste en una hebra de DNA arollada alrededor de un núcleo de histonas.

nucleótido: Nucleósido fosforilado en uno de los grupos hidroxilo de su pentosa.

nucleótido de piridina: Coenzima nucleotídico que contiene el derivado de la piridina, nicotinamida: NAD o NADP.

nucleótidos de flavina: Coenzimas nucleotídicos (FMN y FAD) que contienen riboflavina.

número de Avogadro (N): Número de moléculas en una masa molecular gramo (un mol) de cualquier compuesto ($6{,}02 \times 10^{23}$).

número de enlace (linking number): Número de veces que una hebra de DNA circular cerrado está enrollado sobre otra; número de uniones topológicas que unen los círculos entre sí.

número de recambio: Número de veces que una molécula de enzima transforma una molécula de sustrato por unidad de tiempo en condiciones de actividad máxima a concentraciones saturantes de sustrato.

o

oligoelemento: Elemento químico requerido por un organismo sólo en cantidades mínimas.

oligómero: Polímero corto, normalmente de aminoácidos, azúcares o nucleótidos; la definición de "corto" es algo arbitraria, pero se aplica normalmente a menos de 50 subunidades.

oligonucleótido: Polímero corto formado por nucleótidos (normalmente menos de 50).

oligopéptido: Unos cuantos aminoácidos unidos en enlace peptídico.

oligosacárido: Varios grupos monosacáridos unidos mediante enlace glucosídico.

oncogén: Gen que produce cáncer; cualquiera de varios genes mutantes que hacen que las células muestren una proliferación rápida e incontrolada. *Véase también* protooncogén.

operador: Región del DNA que interacciona con una proteína represora para controlar la expresión de un gen o grupo de genes.

operón: Unidad de expresión genética que consiste en uno o varios genes relacionados además de las secuencias operadora y promotora que regulan su transcripción.

orgánulos: Estructuras rodeadas por membranas que se encuentran en las células eucarióticas; contienen enzimas y otros componentes requeridos para funciones celulares especiales.

origen: Secuencia o sitio nucleotídico en el DNA en donde se inicia la replicación del DNA.

ortólogos: Genes en organismos diferentes que poseen entre sí una relación de secuencia y funcional clara.

ósmosis: Flujo general de agua a través de una membrana semipermeable a otro compartimiento acuoso que contiene soluto a una concentración superior.

oxidación: Pérdida de electrones por parte de un compuesto.

α-oxidación: Ruta alternativa para la oxidación de ácidos grasos β-metilados en los peroxisomas.

β-oxidación: Degradación oxidativa de ácidos grasos a acetil-CoA mediante oxidaciones sucesivas en el átomo de carbono β.

ω-oxidación: Modo alternativo de oxidación de los ácidos grasos en los que la oxidación inicial se produce en el carbono más distante del carbono carboxílico; en contraposición a β-oxidación.

oxidasas: Enzimas que catalizan reacciones de oxidación en las que el oxígeno molecular es el aceptor electrónico pero ninguno de los átomos de oxígeno se incorpora al producto. *Compárese* con oxigenasas.

oxidasas de función mixta: Enzimas (una monooxigenasa, por ejemplo) que catalizan reacciones en las que se oxidan dos reductores, uno de los cuales es generalmente NADPH y el otro es el sustrato. Se incorpora un átomo de oxígeno al producto mientras que el otro se reduce a H_2O. Estos enzimas a menudo emplean el citocromo P-450 para transportar los electrones desde el NADPH al O_2.

oxigenasas: Enzimas que catalizan reacciones en las que se incorporan átomos de oxígeno directamente en el producto, formando un grupo hidroxilo o carboxilo. En reacciones catalizadas por una monooxigenasa, sólo se incorpora uno de los dos átomos de O; el otro se reduce a H_2O. En las reacciones catalizadas por una dioxigenasa se incorporan ambos átomos de O en el producto. *Compárese* con oxidasas.

P

palíndromo: Segmento de DNA dúplex en el que la secuencia de bases de las dos hebras tiene una simetría rotacional binaria alrededor de un eje.

par ácido-base conjugado: Dador de protones y su correspondiente forma desprotonada; por ejemplo, ácido acético (dador) y acetato (aceptor).

par de bases: Dos nucleótidos en cadenas de ácido nucleico que están apareadas por enlaces de hidrógeno: por ejemplo A con T o U y G con C.

par redox: Dador electrónico y su correspondiente forma oxidada, por ejemplo, NADH y NAD^+.

par redox conjugado: Dador electrónico y su correspondiente forma aceptora de electrones; por ejemplo, Cu^+ (dador) y Cu^{2+} (aceptor), o NADH (dador) y NAD^+ (aceptor).

paradigma: En bioquímica, experimento modelo o ejemplo.

paso limitante de velocidad: (1) Generalmente, el paso en una reacción enzimática con la mayor energía de activación o con el estado de transición de mayor energía libre. (2) Paso más lento de una ruta metabólica.

patogénico: Causante de enfermedad.

pauta de lectura: *Véase* marco de lectura.

PCR: *Véase* reacción en cadena de la polimerasa.

PDB (Protein Data Bank): Base de datos internacional (www.rcsb.org/pdb) que archiva los datos que describen la estructura tridimensional de casi todas las macromoléculas de las que se ha publicado la estructura.

pentosa: Azúcar sencillo con un esqueleto que contiene cinco átomos de carbono.

peptidasas: Enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos.

peptidil transferasa: Actividad enzimática mediante la cual se sintetizan enlaces peptídicos de proteínas en los ribosomas; es parte del rRNA de la subunidad ribosómica grande y es, por tanto, un ribozima.

péptido: Dos o más aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos.

peptidoglucano: Componente mayoritario de las paredes celulares bacterianas; generalmente consiste en heteropolisacáridos paralelos entrecruzados con péptidos cortos.

permeasas: *Véase* transportadores.

peroxisoma: Orgánulo rodeado de membrana en las células eucarióticas; contiene enzimas formadores y destructores de peróxido.

pH: Logaritmo negativo de la concentración de ión hidrógeno de una solución acuosa.

pH isoeléctrico (punto isoeléctrico): pH al cual un soluto no tiene carga eléctrica neta, por lo que no se desplaza en un campo eléctrico.

pH óptimo: pH característico al que un enzima tiene su actividad máxima.

pigmentos accesorios: Pigmentos que absorben la luz visible (carotenoides, xantofila y ficobilinas) de las plantas y bacterias fotosintéticas; complementan a la clorofila en la captación de energía a partir de la luz solar.

piranosa: Azúcar sencillo que contiene un anillo hexagonal de pirano.

piridoxal fosfato: Coenzima que contiene la vitamina piridoxina (vitamina B_6); funciona en reacciones que implican transferencia de grupos amino.

pirimidina: Base heterocíclica nitrogenada encontrada en nucleótidos y ácidos nucleicos.

pirofosfatasa: *Véase* pirofosfato inorgánico hidrolasa.

pirofosfato inorgánico hidrolasa: Enzima que hidroliza una molécula de pirofosfato inorgánico dando dos moléculas de (orto)fosfato; también se conoce como pirofosfatasa.

pK_a: Logaritmo negativo de una constante de equilibrio.

plaquetas: Células pequeñas anucleadas que incian la coagulación de la sangre; provienen de células llamadas megacariocitos en la médula ósea. También se conocen como trombocitos.

plasmalógeno: Fosfolípido con un sustituyente éter alquenílico sobre el C-1 del glicerol.

plásmido: Molécula pequeña y circular de DNA que es extracromosómica y se replica de forma independiente; se emplea frecuentemente en ingeniería genética.

plastidio: En las plantas, orgánulo autorreplicante; puede diferenciarse dando lugar a un cloroplasto.

plectonémico: *Véase* motivo.

plegamiento: *Véase* motivo.

pliegue: Patrón de plegamiento de elementos de estructura secundaria observado en una o más proteínas; también se le denomina motivo o estructura supersecundaria.

polar: Hidrofílico o "amante del agua"; describe moléculas o grupos solubles en agua.

polaridad: (1) En química, la distribución no uniforme de electrones en un molécula; las moléculas polares son normalmente solubles en agua. (2) En biología molecular, la distinción entre los extremos 5′ y 3′ de los ácidos nucleicos.

policonector: Fragmento de DNA corto, a menudo sintético, que contiene secuencias de reconocimiento para diversas endonucleasas de restricción.

polimórfico: Describe una proteína de la que existen variantes en la secuencia de aminoácidos en una población de organismos sin que las variaciones destruyan la funcionalidad de la proteína.

polimorfismo de un solo nucleótido (SNP): Cambio de un solo par de bases genómico que ayuda a distinguir una especie de otra o un individuo de otro dentro de un subconjunto de individuos dentro de una población.

polimorfismos de secuencia: Cualquier alteración en la secuencia genómica (cambios de pares de bases, inserciones, deleciones, reordenamientos) que ayudan a distinguir subconjuntos de individuos en una población o a distinguir una especie de otra.

polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP): Variaciones, entre individuos de una población, en la longitud de ciertos fragmentos de restricción dentro de los que se dan ciertas secuencias genómicas. Estas variaciones aparecen como resultado de cambios raros de secuencia que crean o destruyen sitios de restricción en el genoma.

polinucleótido: Secuencia de nucleótidos unidos covalentemente en la que el hidroxilo 3′ de la pentosa de un residuo nucleótido está unido mediante enlace fosfodiéster al hidroxilo en 5′ de la pentosa del siguiente residuo.

polipéptido: Cadena larga de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos; la masa molecular es generalmente inferior a 10.000.

polirribosoma: *Véase* polisoma.

polisacárido: Polímero lineal o ramificado de unidades monosacáridas unidas por enlaces glucosídicos.

polisoma: Complejo de una molécula de mRNA y dos o más ribosomas; también se denomina polirribosoma.

porfiria: Condición genética debida a la falta de uno o más enzimas necesarios para sintetizar porfirinas.

porfirina: Compuesto nitrogenado complejo que contiene cuatro pirroles sustituidos unidos covalentemente formando un anillo; a menudo forma complejo con un átomo metálico central.

potencial de fosforilación (ΔG_p): Variación de energía libre real de la hidrólisis del ATP en las condiciones no estándar que prevalecen dentro de una célula.

potencial de membrana (V_m): Diferencia de potencial eléctrico a través de una membrana biológica, medida normalmente mediante la inserción de un microelectrodo. Los potenciales de membrana típicos varían desde –25 mV (por convencion el signo negativo indica que el interior es negativo en relación al exterior) a más de –100 mV a través de las membranas de algunas vacuolas vegetales.

potencial de reducción estándar (E'°): Fuerza electromotriz mostrada en un electrodo por concentraciones 1 M de un agente reductor y su forma oxidada a 25 °C y pH 7,0; es una medida de la tendencia relativa del agente reductor a perder electrones.

potencial de transferencia de grupo: Medida de la capacidad de un compuesto para ceder un grupo activado tal como un grupo fosfato o acilo; se expresa generalmente en forma de energía libre estándar de hidrólisis.

potencial electroquímico: Energía que se requiere para mantener una separación de carga y de concentración a través de una membrana.

PPAR (receptor peroxisómico activado por proliferador): Familia de factores de transcripción nucleares, activados por ligandos lipídicos, que alteran la expresión de genes específicos, incluidos los que codifican enzimas de la síntesis y degradación de lípidos.

presión osmótica: Presión generada por el flujo osmótico de agua a través de una membrana semipermeable a un compartimiento acuoso que contiene soluto a una concentración superior.

primasa: Enzima que cataliza la formación de oligonucleótidos de RNA utilizados como cebadores por las DNA polimerasas.

primera ley de la temodinámica: Ley que establece que en todos los procesos la energía total del universo permanece constante.

primosoma: Complejo enzimático que sintetiza los cebadores requeridos para la síntesis de la hebra rezagada del DNA.

procariota: Término utilizado históricamente para designar cualquier especie de los reinos Bacteria y Arquea (arqueobateria). Las difencias entre bacterias (antes llamadas "eubacterias") y las arqueobaterias son suficientemente grandes, de modo que el término inclusivo es de utilidad marginal. La tendencia a utilizar "procariota" al referirse sólo a las bacterias es frecuente pero equívoco; "procariota" implica también una relación ancestral con los eucariotas, por lo que es incorrecto. En este texto no se usan ni "procariota" ni "procariótico".

procesividad: Para cualquier enzima que cataliza la síntesis de un polímero biológico, la propiedad de añadir múltiples subunidades al polímero sin disociarse del sustrato.

producto iónico del agua (K_w): Producto de las concentraciones de H^+ y OH^- en el agua pura: $K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}$ a 25 °C.

promotor: Secuencia de DNA a la que se puede unir la RNA polimerasa, lo que lleva al inicio de la transcripción.

propiedades coligativas: Propiedades de las soluciones que dependen del número de partículas de soluto por unidad de volumen; por ejemplo, la disminución del punto de congelación.

prostaglandinas: Clase de moléculas reguladoras liposolubles de tipo hormonal que provienen del araquidonato y otros ácidos grasos poliinsaturados.

proteasoma: Conjunto supramolecular de complejos enzimáticos que funcionan en la degradación de proteínas celulares dañadas o no necesarias.

Protein Data Bank: *Véase* PDB.

proteína: Macromolécula compuesta por una o varias cadenas polipeptídicas cada una de las cuales tiene una secuencia característica de aminoácidos unidos por enlace peptídico.

proteína activadora de gen por catabolito (CAP): *Véase* proteína receptora de cAMP.

proteína alostérica: Proteína (generalmente con varias subunidades) con múltiples sitios de fijación de ligando de modo que la fijación de ligando a un sitio afecta a la fijación de ligando en otro.

proteína conjugada: Proteína que contiene uno o varios grupos prostéticos.

proteína de fusión: (1) Familia de proteínas que facilitan la fusión de membranas. (2) Producto proteico de un gen creado por fusión de dos genes, o porciones de genes, distintos.

proteína desnaturalizada: Proteína que ha perdido una parte suficiente de su conformación nativa por exposición a un agente desestabilizante tal como el calor o un detergente de modo que ha perdido su función.

proteína ferro-sulfurada: Miembro de una extensa familia de proteínas transferidoras de electrones en las que el transportador electrónico es uno o más iones hierro asociados con dos o más átomos de azufre pertenecientes a residuos Cys o de iones sulfuro inorgánicos.

proteína ferro-sulfurada de Rieske: Tipo de proteína ferro-sulfurada en la que dos de los ligandos al ión de hierro central son cadenas laterales de His. Estas proteínas actúan en muchas secuencias de transferencia de electrones, entre las que se incluyen la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación.

proteína fluorescente verde (GFP): Pequeña proteína de un organismo marino que produce una fluorescencia brillante en la región verde del espectro visible. Proteínas de fusión con GFP se utilizan frecuentemente para determinar la localización subcelular de la proteína fusionada mediante microscopia de fluorescencia.

proteína G estimuladora (G_s): Proteína fijadora de GTP trimérica reguladora que cuando es activada por un receptor de membrana plasmática asociado, estimula un enzima de membrana próximo, como la adenilil ciclasa. G_s tiene unos efectos opuestos a los de G_i.

proteína G inhibidora (G_i): Proteína trimérica fijadora de GTP que, cuando está activada por un receptor de membrana plasmática asociado, actúa *inhibiendo* un enzima de membrana vecino tal como la adenilil ciclasa. G_i tiene efectos opuestos a los de G_s.

proteína ligadora de nucleótido de guanosina: Miembro de una familia de proteínas reguladoras que unen GDP o GTP, son activas en la forma que contiene GTP unido y tienen actividad GTPasa intrínseca que las inactiva.

proteína oligomérica: Proteína con varias subunidades que tiene dos o más cadenas polipeptídicas idénticas.

proteína quinasas: Enzimas que transfieren el grupo fosforilo terminal del ATP u otro nucleósido trifosfato a la cadena lateral de una Ser, Thr, Tyr, Asp o His en una proteína diana, regulando de este modo la actividad u otras propiedades de esa proteína.

proteína receptora de cAMP (CRP): En las bacterias proteína reguladora específica que controla el inicio de la trancripción de los genes produciendo los enzimas requeridos por la célula para utilizar otros nutrientes cuando no hay glucosa. También denominada proteína activadora de gen por catabolito (CAP).

proteína simple: Proteína que sólo da lugar a aminoácidos cuando se hidroliza.

proteínas anfitrópicas: Proteínas que se asocian reversiblemente con la membrana, con lo que se pueden encontrar en el citsol, en la membrana o en los dos.

proteínas armazón (scaffold): Proteínas no catalíticas que hacen de centro de nucleación en la formación de complejos multienzimáticos proporcionando dos o más sitios específicos de unión para estas proteínas.

proteínas férricas no hemo: Proteínas que actúan normalmente en reacciones de oxidación-reducción que contienen hierro pero no grupos porfirínicos.

proteínas fibrosas: Proteínas insolubles que tienen un papel protector o estructural; contienen cadenas polipeptídicas que comparten una estructura secundaria común.

proteínas G: Familia de proteínas fijadoras de GTP heterotriméricas que actúan en rutas de señalización intracelular. Normalmente la unión

de un ligando a un receptor acoplado a proteína G induce el intercambio de GTP por GDP unido, permitiendo que la proteína G active un enzima posterior en la ruta de señalización. Las proteínas G tienen una actividad GTPasa intrínseca, motivo por el cual son autoinactivantes.

proteínas globulares: Proteínas solubles con una forma globular (redondeada).

proteínas homólogas: Proteínas con secuencias y funciones similares en diferentes especies; por ejemplo, las hemoglobinas.

proteínas integrales: Proteínas fuertemente unidas a una membrana mediante interacciones hidrofóbicas; en contraposición a proteínas periféricas.

proteínas periféricas: Proteínas que están débil o reversiblemente unidas a una membrana mediante puentes de hidrógeno o fuerzas electrostáticas; generalmente son hidrosolubles cuando se liberan de la membrana.

proteínas plasmáticas: Proteínas presentes en el plasma sanguíneo.

proteoglucano: Macromolécula híbrida formada por un heteropolisacárido unido a un polipéptido; el polisacárido es el componente mayoritario.

proteoma: Dotación completa de proteínas expresadas en una célula determinada, o la dotación completa de proteínas que pueden ser expresadas por un genoma determinado.

proteómica: En sentido amplio, el estudio de la dotación proteica de una célula u organismo.

protómero: Término general que describe cualquier unidad repetida de una o más subunidades proteicas asociadas de manera estable en una estructura proteica mayor. Si un protómero tiene múltiples subunidades, éstas pueden ser idénticas o diferentes.

protooncogén: Gen celular, normalmente codificante de una proteína reguladora, que se puede convertir en oncogén por mutación.

protoplasma: Término general utilizado para referirse a todo el contenido de una célula.

prueba de Ames: Prueba sencilla de carcinógenos en la que se utilizan bacterias y que está basada en la suposición de que los carcinógenos son mutágenos.

PUFA (ácido graso poliinsaturado): Ácido graso con más de un doble enlace, generalmente no conjugados.

purina: Base heterocíclica nitrogenada presente en nucleótidos y ácidos nucleicos; contiene anillos fusionados de pirimidina e imidazol.

puromicina: Antibiótico que inhibe la síntesis de polipéptidos al incorporarse en una cadena polipeptídica en fase de crecimiento dando lugar a su terminación prematura.

q

queratinas: Proteínas insolubles de protección o estructurales formadas por cadenas polipeptídicas paralelas en conformaciones α-helicoidal o β.

quilomicrón: Lipoproteína plasmática que consiste en una gran gotícula de triacilgliceroles estabilizados por una capa de proteína y fosfolípido; transporta lípidos desde el intestino a los tejidos.

quimiotaxis: Captación por la célula de un agente químico específico que provoca un movimiento hacia, o en dirección opuesta, al mismo.

quimiótrofo: Organismo que obtiene su energía metabolizando compuestos orgánicos producidos por otros organismos.

quimotripsina: Proteasa bien estudiada que corta polipéptidos por el lado carbonílico de residuos aminoácidos con cadenas laterales aromáticas.

quimotripsinógeno: Zimógeno (inactivo) precursor de la quimotripsina.

quinasas: Enzimas que catalizan la fosforilación de ciertas moléculas por el ATP.

r

radiación ionizante: Tipo de radiación, como los rayos X, que produce la pérdida de electrones de algunas moléculas orgánicas, haciéndolas de este modo más reactivas.

radiación ultravioleta (UV): Radiación electromagnética en la región de 200 a 400 nm.

radical: Átomo o grupo de átomos que poseen un electrón sin aparear; también denominado radical libre.

radical libre: *Véase* radical.

radioinmunoensayo (RIA): Método cuantitativo sensible para detectar indicios de una biomolécula basado en su capacidad de desplazar una forma radiactiva de la molécula de su combinación con un anticuerpo específico.

rasgo falciforme: Condición humana que se reconoce por la adopción de una forma de hoz por parte de los eritrocitos cuando se exponen a tensiones bajas de oxígeno; se da en individuos heterozigóticos con respecto al alelo responsable de la anemia falciforme.

razón P/O: Número de moles de ATP formados en la fosforilación oxidativa por $^1/_2$ O_2 reducido (es decir, por par de electrones pasados al O_2). Los valores experimentales utilizados en este texto son 2,5 para el paso de electrones desde el NADH al O_2 y 1,5 para el paso de electrones desde el $FADH_2$ al O_2. Algunos libros de texto utilizan valores integrales de 3,0 y 2,0.

reacción anaplerótica: Reacción catalizada enzimáticamente que repone el suministro de intermediarios del ciclo del ácido cítrico.

reacción de fijación del carbono: Reacción catalizada por la rubisco durante la fotosíntesis, o por otras carboxilasas, en las que el CO_2 atmosférico es inicialmente incorporado (fijado) en un compuesto orgánico.

reacción de Hill: Desprendimiento de oxígeno y fotorreducción de un aceptor electrónico artificial por una preparación de cloroplastos en ausencia de dióxido de carbono.

reacción de la ninhidrina: Reacción coloreada dada por los aminoácidos y péptidos cuando se calientan con ninhidrina; ampliamente utilizada para su detección y cuantificación.

reacción de oxidación-reducción: Reacción en la que se transfieren electrones desde una molécula dadora a una aceptora; también se denomina reacción redox.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Procedimiento repetitivo de laboratorio que da lugar a una amplificación geométrica de una secuencia específica de DNA.

reacción endergónica: Reacción química que consume energía (es decir, para la que ΔG es positiva).

reacción endotérmica: Reacción química que absorbe calor (es decir, la ΔH es positiva).

reacción exergónica: Reacción química que transcurre con la liberación de energía libre (esto es, para la que ΔG es negativa).

reacción exotérmica: Reacción química que libera calor (es decir, que ΔH es negativa).

reacción redox: *Véase* reacción de oxidación-reducción.

reacciones acopladas: Dos reacciones químicas que tienen un intermediario común y, por tanto, un medio de transferencia de energía de una a otra.

reacciones de asimilación del carbono: Secuencia de reacciones en las que el CO_2 atmosférico se convierte en compuestos orgánicos.

reacciones dependientes de la luz: Reacciones de la fotosíntesis que requieren luz y que no pueden tener lugar en la oscuridad; también se conocen como reacciones luminosas.

reacciones oscuras: *Véase* reacciones de asimilación de carbono.

receptores acoplados a proteína G (GPRC): Gran familia de proteínas de receptores de membrana con siete segmentos helicoidales transmembrana. Estos receptores se asocian frecuentemente con proteínas G para transducir una señal extracelular en un cambio del metabolismo celular. También denominados receptores serpentina y receptores heptahelicoidales.

receptores serpentina *Véase* receptores acoplados a proteína G.

receptor de peroxisomas activado por proliferador: *Véase* PPAR.

receptor hormonal: Proteína en células diana, o en su superficie, que fija una hormona específica e inicia la respuesta celular.

recombinación: Cualquier proceso enzimático por el que el ordenamiento lineal de secuencias de ácido nucleico en un cromosoma se altera mediante rotura y religación.

recombinación específica de sitio: Tipo de recombinación genética que sólo tiene lugar en secuencias específicas.

recombinación genética homóloga: Recombinación entre dos moléculas de DNA de secuencia similar, que se da en todas las células; tiene lugar durante la meiosis y la mitosis en los eucariotas.

polisacárido: Polímero lineal o ramificado de unidades monosacáridas unidas por enlaces glucosídicos.

polisoma: Complejo de una molécula de mRNA y dos o más ribosomas; también se denomina polirribosoma.

porfiria: Condición genética debida a la falta de uno o más enzimas necesarios para sintetizar porfirinas.

porfirina: Compuesto nitrogenado complejo que contiene cuatro pirroles sustituidos unidos covalentemente formando un anillo; a menudo forma complejo con un átomo metálico central.

potencial de fosforilación (ΔG_p): Variación de energía libre real de la hidrólisis del ATP en las condiciones no estándar que prevalecen dentro de una célula.

potencial de membrana (V_m): Diferencia de potencial eléctrico a través de una membrana biológica, medida normalmente mediante la inserción de un microelectrodo. Los potenciales de membrana típicos varían desde –25 mV (por convencion el signo negativo indica que el interior es negativo en relación al exterior) a más de –100 mV a través de las membranas de algunas vacuolas vegetales.

potencial de reducción estándar (E'°): Fuerza electromotriz mostrada en un electrodo por concentraciones 1 M de un agente reductor y su forma oxidada a 25 °C y pH 7,0; es una medida de la tendencia relativa del agente reductor a perder electrones.

potencial de transferencia de grupo: Medida de la capacidad de un compuesto para ceder un grupo activado tal como un grupo fosfato o acilo; se expresa generalmente en forma de energía libre estándar de hidrólisis.

potencial electroquímico: Energía que se requiere para mantener una separación de carga y de concentración a través de una membrana.

PPAR (receptor peroxisómico activado por proliferador): Familia de factores de transcripción nucleares, activados por ligandos lipídicos, que alteran la expresión de genes específicos, incluidos los que codifican enzimas de la síntesis y degradación de lípidos.

presión osmótica: Presión generada por el flujo osmótico de agua a través de una membrana semipermeable a un compartimiento acuoso que contiene soluto a una concentración superior.

primasa: Enzima que cataliza la formación de oligonucleótidos de RNA utilizados como cebadores por las DNA polimerasas.

primera ley de la temodinámica: Ley que establece que en todos los procesos la energía total del universo permanece constante.

primosoma: Complejo enzimático que sintetiza los cebadores requeridos para la síntesis de la hebra rezagada del DNA.

procariota: Término utilizado históricamente para designar cualquier especie de los reinos Bacteria y Arquea (arqueobateria). Las difencias entre bacterias (antes llamadas "eubacterias") y las arqueobaterias son suficientemente grandes, de modo que el término inclusivo es de utilidad marginal. La tendencia a utilizar "procariota" al referirse sólo a las bacterias es frecuente pero equívoco; "procariota" implica también una relación ancestral con los eucariotas, por lo que es incorrecto. En este texto no se usan ni "procariota" ni "procariótico".

procesividad: Para cualquier enzima que cataliza la síntesis de un polímero biológico, la propiedad de añadir múltiples subunidades al polímero sin disociarse del sustrato.

producto iónico del agua (K_w): Producto de las concentraciones de H^+ y OH^- en el agua pura: $K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}$ a 25 °C.

promotor: Secuencia de DNA a la que se puede unir la RNA polimerasa, lo que lleva al inicio de la transcripción.

propiedades coligativas: Propiedades de las soluciones que dependen del número de partículas de soluto por unidad de volumen; por ejemplo, la disminución del punto de congelación.

prostaglandinas: Clase de moléculas reguladoras liposolubles de tipo hormonal que provienen del araquidonato y otros ácidos grasos poliinsaturados.

proteasoma: Conjunto supramolecular de complejos enzimáticos que funcionan en la degradación de proteínas celulares dañadas o no necesarias.

Protein Data Bank: *Véase* PDB.

proteína: Macromolécula compuesta por una o varias cadenas polipeptídicas cada una de las cuales tiene una secuencia característica de aminoácidos unidos por enlace peptídico.

proteína activadora de gen por catabolito (CAP): *Véase* proteína receptora de cAMP.

proteína alostérica: Proteína (generalmente con varias subunidades) con múltiples sitios de fijación de ligando de modo que la fijación de ligando a un sitio afecta a la fijación de ligando en otro.

proteína conjugada: Proteína que contiene uno o varios grupos prostéticos.

proteína de fusión: (1) Familia de proteínas que facilitan la fusión de membranas. (2) Producto proteico de un gen creado por fusión de dos genes, o porciones de genes, distintos.

proteína desnaturalizada: Proteína que ha perdido una parte suficiente de su conformación nativa por exposición a un agente desestabilizante tal como el calor o un detergente de modo que ha perdido su función.

proteína ferro-sulfurada: Miembro de una extensa familia de proteínas transferidoras de electrones en las que el transportador electrónico es uno o más iones hierro asociados con dos o más átomos de azufre pertenecientes a residuos Cys o de iones sulfuro inorgánicos.

proteína ferro-sulfurada de Rieske: Tipo de proteína ferro-sulfurada en la que dos de los ligandos al ión de hierro central son cadenas laterales de His. Estas proteínas actúan en muchas secuencias de transferencia de electrones, entre las que se incluyen la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación.

proteína fluorescente verde (GFP): Pequeña proteína de un organismo marino que produce una fluorescencia brillante en la región verde del espectro visible. Proteínas de fusión con GFP se utilizan frecuentemente para determinar la localización subcelular de la proteína fusionada mediante microscopia de fluorescencia.

proteína G estimuladora (G_s): Proteína fijadora de GTP trimérica reguladora que cuando es activada por un receptor de membrana plasmática asociado, estimula un enzima de membrana próximo, como la adenilil ciclasa. G_s tiene unos efectos opuestos a los de G_i.

proteína G inhibidora (G_i): Proteína trimérica fijadora de GTP que, cuando está activada por un receptor de membrana plasmática asociado, actúa *inhibiendo* un enzima de membrana vecino tal como la adenilil ciclasa. G_i tiene efectos opuestos a los de G_s.

proteína ligadora de nucleótido de guanosina: Miembro de una familia de proteínas reguladoras que unen GDP o GTP, son activas en la forma que contiene GTP unido y tienen actividad GTPasa intrínseca que las inactiva.

proteína oligomérica: Proteína con varias subunidades que tiene dos o más cadenas polipeptídicas idénticas.

proteína quinasas: Enzimas que transfieren el grupo fosforilo terminal del ATP u otro nucleósido trifosfato a la cadena lateral de una Ser, Thr, Tyr, Asp o His en una proteína diana, regulando de este modo la actividad u otras propiedades de esa proteína.

proteína receptora de cAMP (CRP): En las bacterias proteína reguladora específica que controla el inicio de la trancripción de los genes produciendo los enzimas requeridos por la célula para utilizar otros nutrientes cuando no hay glucosa. También denominada proteína activadora de gen por catabolito (CAP).

proteína simple: Proteína que sólo da lugar a aminoácidos cuando se hidroliza.

proteínas anfitrópicas: Proteínas que se asocian reversiblemente con la membrana, con lo que se pueden encontrar en el citsol, en la membrana o en los dos.

proteínas armazón (scaffold): Proteínas no catalíticas que hacen de centro de nucleación en la formación de complejos multienzimáticos proporcionando dos o más sitios específicos de unión para estas proteínas.

proteínas férricas no hemo: Proteínas que actúan normalmente en reacciones de oxidación-reducción que contienen hierro pero no grupos porfirínicos.

proteínas fibrosas: Proteínas insolubles que tienen un papel protector o estructural; contienen cadenas polipeptídicas que comparten una estructura secundaria común.

proteínas G: Familia de proteínas fijadoras de GTP heterotriméricas que actúan en rutas de señalización intracelular. Normalmente la unión

de un ligando a un receptor acoplado a proteína G induce el intercambio de GTP por GDP unido, permitiendo que la proteína G active un enzima posterior en la ruta de señalización. Las proteínas G tienen una actividad GTPasa intrínseca, motivo por el cual son autoinactivantes.

proteínas globulares: Proteínas solubles con una forma globular (redondeada).

proteínas homólogas: Proteínas con secuencias y funciones similares en diferentes especies; por ejemplo, las hemoglobinas.

proteínas integrales: Proteínas fuertemente unidas a una membrana mediante interacciones hidrofóbicas; en contraposición a proteínas periféricas.

proteínas periféricas: Proteínas que están débil o reversiblemente unidas a una membrana mediante puentes de hidrógeno o fuerzas electrostáticas; generalmente son hidrosolubles cuando se liberan de la membrana.

proteínas plasmáticas: Proteínas presentes en el plasma sanguíneo.

proteoglucano: Macromolécula híbrida formada por un heteropolisacárido unido a un polipéptido; el polisacárido es el componente mayoritario.

proteoma: Dotación completa de proteínas expresadas en una célula determinada, o la dotación completa de proteínas que pueden ser expresadas por un genoma determinado.

proteómica: En sentido amplio, el estudio de la dotación proteica de una célula u organismo.

protómero: Término general que describe cualquier unidad repetida de una o más subunidades proteicas asociadas de manera estable en una estructura proteica mayor. Si un protómero tiene múltiples subunidades, éstas pueden ser idénticas o diferentes.

protooncogén: Gen celular, normalmente codificante de una proteína reguladora, que se puede convertir en oncogén por mutación.

protoplasma: Término general utilizado para referirse a todo el contenido de una célula.

prueba de Ames: Prueba sencilla de carcinógenos en la que se utilizan bacterias y que está basada en la suposición de que los carcinógenos son mutágenos.

PUFA (ácido graso poliinsaturado): Ácido graso con más de un doble enlace, generalmente no conjugados.

purina: Base heterocíclica nitrogenada presente en nucleótidos y ácidos nucleicos; contiene anillos fusionados de pirimidina e imidazol.

puromicina: Antibiótico que inhibe la síntesis de polipéptidos al incorporarse en una cadena polipeptídica en fase de crecimiento dando lugar a su terminación prematura.

q

queratinas: Proteínas insolubles de protección o estructurales formadas por cadenas polipeptídicas paralelas en conformaciones α-helicoidal o β.

quilomicrón: Lipoproteína plasmática que consiste en una gran gotícula de triacilglicéroles estabilizados por una capa de proteína y fosfolípido; transporta lípidos desde el intestino a los tejidos.

quimiotaxis: Captación por la célula de un agente químico específico que provoca un movimiento hacia, o en dirección opuesta, al mismo.

quimiótrofo: Organismo que obtiene su energía metabolizando compuestos orgánicos producidos por otros organismos.

quimotripsina: Proteasa bien estudiada que corta polipéptidos por el lado carbonílico de residuos aminoácidos con cadenas laterales aromáticas.

quimotripsinógeno: Zimógeno (inactivo) precursor de la quimotripsina.

quinasas: Enzimas que catalizan la fosforilación de ciertas moléculas por el ATP.

r

radiación ionizante: Tipo de radiación, como los rayos X, que produce la pérdida de electrones de algunas moléculas orgánicas, haciéndolas de este modo más reactivas.

radiación ultravioleta (UV): Radiación electromagnética en la región de 200 a 400 nm.

radical: Átomo o grupo de átomos que poseen un electrón sin aparear; también denominado radical libre.

radical libre: *Véase* radical.

radioinmunoensayo (RIA): Método cuantitativo sensible para detectar indicios de una biomolécula basado en su capacidad de desplazar una forma radiactiva de la molécula de su combinación con un anticuerpo específico.

rasgo falciforme: Condición humana que se reconoce por la adopción de una forma de hoz por parte de los eritrocitos cuando se exponen a tensiones bajas de oxígeno; se da en individuos heterozigóticos con respecto al alelo responsable de la anemia falciforme.

razón P/O: Número de moles de ATP formados en la fosforilación oxidativa por $\frac{1}{2}$ O_2 reducido (es decir, por par de electrones pasados al O_2). Los valores experimentales utilizados en este texto son 2,5 para el paso de electrones desde el NADH al O_2 y 1,5 para el paso de electrones desde el $FADH_2$ al O_2. Algunos libros de texto utilizan valores integrales de 3,0 y 2,0.

reacción anaplerótica: Reacción catalizada enzimáticamente que repone el suministro de intermediarios del ciclo del ácido cítrico.

reacción de fijación del carbono: Reacción catalizada por la rubisco durante la fotosíntesis, o por otras carboxilasas, en las que el CO_2 atmosférico es inicialmente incorporado (fijado) en un compuesto orgánico.

reacción de Hill: Desprendimiento de oxígeno y fotorreducción de un aceptor electrónico artificial por una preparación de cloroplastos en ausencia de dióxido de carbono.

reacción de la ninhidrina: Reacción coloreada dada por los aminoácidos y péptidos cuando se calientan con ninhidrina; ampliamente utilizada para su detección y cuantificación.

reacción de oxidación-reducción: Reacción en la que se transfieren electrones desde una molécula dadora a una aceptora; también se denomina reacción redox.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Procedimiento repetitivo de laboratorio que da lugar a una amplificación geométrica de una secuencia específica de DNA.

reacción endergónica: Reacción química que consume energía (es decir, para la que ΔG es positiva).

reacción endotérmica: Reacción química que absorbe calor (es decir, la ΔH es positiva).

reacción exergónica: Reacción química que transcurre con la liberación de energía libre (esto es, para la que ΔG es negativa).

reacción exotérmica: Reacción química que libera calor (es decir, que ΔH es negativa).

reacción redox: *Véase* reacción de oxidación-reducción.

reacciones acopladas: Dos reacciones químicas que tienen un intermediario común y, por tanto, un medio de transferencia de energía de una a otra.

reacciones de asimilación del carbono: Secuencia de reacciones en las que el CO_2 atmosférico se convierte en compuestos orgánicos.

reacciones dependientes de la luz: Reacciones de la fotosíntesis que requieren luz y que no pueden tener lugar en la oscuridad; también se conocen como reacciones luminosas.

reacciones oscuras: *Véase* reacciones de asimilación de carbono.

receptores acoplados a proteína G (GPRC): Gran familia de proteínas de receptores de membrana con siete segmentos helicoidales transmembrana. Estos receptores se asocian frecuentemente con proteínas G para transducir una señal extracelular en un cambio del metabolismo celular. También denominados receptores serpentina y receptores heptahelicoidales.

receptores serpentina *Véase* receptores acoplados a proteína G.

receptor de peroxisomas activado por proliferador: *Véase* PPAR.

receptor hormonal: Proteína en células diana, o en su superficie, que fija una hormona específica e inicia la respuesta celular.

recombinación: Cualquier proceso enzimático por el que el ordenamiento lineal de secuencias de ácido nucleico en un cromosoma se altera mediante rotura y religación.

recombinación específica de sitio: Tipo de recombinación genética que sólo tiene lugar en secuencias específicas.

recombinación genética homóloga: Recombinación entre dos moléculas de DNA de secuencia similar, que se da en todas las células; tiene lugar durante la meiosis y la mitosis en los eucariotas.

reducción: Ganancia de electrones por parte de un compuesto o un ión.

regulación metabólica: Mecanismos mediante los que una célula resiste cambios en la concentración de metabolitos individuales que, en caso contrario, tendrían lugar cuando los mecanismos de control metabólico alteran el flujo a través de la ruta.

regulón: Grupo de genes u operones que están regulados de forma coordinada aunque algunos, o todos, pueden estar espacialmente distantes dentro del cromosoma o genoma.

renaturalización: Plegamiento de una proteína globular desplegada (desnaturalizada) de modo que se restaura la estructura nativa y la función.

reparación de apareamientos incorrectos: Sistema enzimático para reparar apareamientos de bases incorrectos en el DNA.

reparación de DNA por recombinación: Procesos recombinatorios dirigidos a reparar roturas de hebras o entrecruzamientos del DNA, especialmente en horquillas de replicación inactivadas.

repetición corta en tándem (STR): Secuencia de DNA corta (típicamente 3 a 6 pb), repetida muchas veces en tándem en una localización particular de un cromosoma.

replicación: Síntesis de una molécula de ácido nucleico hija idéntica al ácido nucleico parental.

replisoma: Complejo multiproteico que promueve la síntesis de DNA en la horquilla de replicación.

represión: Disminución en la expresión de un gen en respuesta a un cambio en la actividad de una proteína reguladora.

represor: Proteína que se une a la secuencia reguladora u operador de un gen bloqueando su transcripción.

represor de la traducción: Represor que se fija a un mRNA bloqueando la traducción.

residuo: Unidad sencilla dentro de un polímero; por ejemplo, un aminoácido dentro de una cadena polipeptídica. El término refleja el hecho de que azúcares, nucleótidos y aminoácidos pierden unos cuantos átomos (generalmente los elementos del agua) al incorporarse en sus polímeros respectivos.

residuo amino-terminal: El único residuo aminoácido de una cadena polipeptídica que tiene un grupo α-amino libre; define el extremo amino del polipéptido.

residuo carboxilo-terminal: Único residuo aminoácido en una cadena polipeptídica que tiene un grupo α-carboxilo libre; define el extremo carboxilo del polipéptido.

resina de intercambio aniónico: Resina polimérica con grupos catiónicos incorporados; se utiliza en la separación cromatográfica de aniones.

resina de intercambio catiónico: Polímero insoluble con cargas negativas incorporadas; utilizada en la separación cromatográfica de sustancias catiónicas.

resina de intercambio iónico: Resina polimérica que contiene grupos cargados; se utiliza en columnas de cromatografía para separar compuestos iónicos.

respiración: Cualquier proceso metabólico que conduce a la captación de oxígeno y a la liberación de CO_2.

respuesta inmune: Capacidad de los vertebrados de generar anticuerpos contra un antígeno, macromolécula extraña al organismo.

respuesta SOS: En las bacterias, inducción coordinada de una serie de genes en respuesta a niveles elevados de lesiones en el DNA.

retículo endoplasmático: Extenso sistema de dobles membranas en el citoplasma de la células eucarióticas; comprende canales secretores y está a menudo claveteado con ribosomas (retículo endoplasmático rugoso).

retroalimentación negativa: Regulación de una ruta bioquímica en la que un producto de reacción inhibe un paso anterior de la vía.

retroinhibición: Inhibición de un enzima alostérico al principio de una secuencia metabólica por el producto final de la secuencia; también se conoce como inhibición por producto final.

retromutación: Mutación que hace que un gen mutante recupere su secuencia de bases del tipo salvaje.

retrovirus: Virus RNA que contiene una transcriptasa inversa.

ribointerruptor: Segmento estructurado de un mRNA que se une a un ligando específico y afecta la traducción o maduración del mRNA.

ribonucleasa: Nucleasa que cataliza la hidrólisis de ciertos enlaces internucleotídicos del RNA.

ribonucleótido: Nucleótido que contiene D-ribosa como componente pentosa.

ribosoma: Complejo supramolecular de rRNA y proteínas que tiene aproximadamente de 18 a 22 nm de diámetro; sitio de la síntesis de proteínas.

ribozimas: Moléculas de ácido ribonucleico con actividad catalítica: enzimas RNA.

RMN: *Véase* espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

RNA (ácido ribonucleico): Polirribonucleótido de secuencia específica unido por enlaces fosfodiéster 3′,5′ sucesivos.

RNA de transferencia (tRNA): Clase de moléculas de RNA (M_r 25.000 a 30.000) cada una de las cuales se combina covalentemente con un aminoácido específico como primer paso de la síntesis de proteínas.

RNA mensajero (mRNA): Clase de moléculas de RNA, cada una de las cuales es complementaria de una cadena de DNA; es portador del mensaje genético desde el cromosoma a los ribosomas.

RNA nocodificante: *Véase* ncRNA.

RNA nuclear pequeño (snRNA): Clase de RNA corto, generalmente de 100 a 200 nucleótidos, presentes en el núcleo y que intervienen en las reacciones de corte y empalme de mRNA eucarióticos.

RNA nucleolar pequeño (snoRNA): Clase de RNA cortos, normalmente de 60 a 300 nucleótidos de longitud, que guían la modificación de rRNA en el nucleolo.

RNA polimerasa: Enzima que cataliza la formación de RNA a partir de ribonucleósidos 5′-trifosfatos utilizando una hebra de DNA o RNA como molde.

RNA ribosómico (rRNA): Clase de moléculas de RNA que son componentes de los ribosomas.

ROS: *Véase* especie reactiva de oxígeno.

rotación específica: Rotación, en grados, del plano de la luz polarizada (línea D del sodio) por un compuesto ópticamente activo a 25 °C, con una concentración y paso de luz especificados.

rRNA: *Véase* RNA ribosómico.

RTK: *Véase* Tyr quinasa de receptor.

ruta anfibólica: Ruta metabólica utilizada tanto en el catabolismo como en el anabolismo.

ruta de las hexosas monofosfato: *Véase* ruta de las pentosas fosfato.

ruta de las pentosas fosfato: Ruta presente en la mayoría de organismos que sirve para interconvertir hexosas y pentosas y que es fuente de equivalentes de reducción (NADPH) y pentosas para procesos biosintéticos; empieza con glucosa 6-fosfato como intermediario. También se la denomina ruta del fosfogluconato y ruta de las hexosas monofosfato.

ruta de novo: Ruta para la síntesis de una biomolécula, por ejemplo un nucleótido, a partir de precursores sencillos; en contraposición a ruta de recuperación.

ruta de recuperación: Síntesis de una biomolécula, por ejemplo un nucleótido, a partir de intermediarios en la ruta degradativa de la biomolécula; ruta de reciclado a diferencia de la ruta de novo.

ruta del fosfogluconato: *Véase* ruta de las pentosas fosfato.

S

sales biliares: Derivados esteroideos anfipáticos con propiedades detergentes que participan en la digestión y absorción de lípidos.

saponificación: Hidrólisis alcalina de triacilgliceroles que dan ácidos grasos en forma de jabones.

sarcómero: Unidad funcional y estructural del sistema contráctil del músculo.

secuencia conductora (leader): Corta secuencia cerca del extremo amino-terminal de una proteína o del extremo 5′ de un RNA que tiene una función especializada de direccionalidad o reguladora.

secuencia consenso: Secuencia de DNA o aminoácidos que consiste en residuos que aparecen con mayor frecuencia en cada posición dentro de un conjunto de secuencias similares.

secuencia de inserción: Secuencias específicas de bases en cada extremo de un segmento de DNA transponible.

secuencia de terminación: Secuencia de DNA que aparece al final de una unidad de transcripción y que señala el final de la transcripción.

secuencia reguladora: Secuencia de DNA que interviene en la regulación de la expresión de un gen; por ejemplo, un promotor o un operador.

secuencia señal: Secuencia de aminoácidos, a menudo en el extremo amino-terminal, que indica el destino celular de una proteína recién sintetizada.

secuencia Shine-Dalgarno: Secuencia dentro de un mRNA requerida para la unión a ribosomas bacterianos.

segunda ley de la termodinámica: Ley que establece que en cualquier proceso químico o físico la entropía del universo tiende a aumentar.

segundo mensajero: Molécula efectora sintetizada dentro de una célula en respuesta a una señal externa (primer mensajero) tal como una hormona.

selectinas: Gran familia de proteínas de membrana, lectinas que unen fuerte y específicamente oligosacáridos de otras células y que sirven para transportar señales a través de la membrana plasmática.

SELEX: Método para la identificación experimental rápida de secuencias de ácidos nucleicos (normalmente RNA) que tienen propiedades catalíticas o de unión de ligando específicas.

sialoadhesinas: Lectina en la superficie exterior de una célula que une ligandos glucídicos con ácidos siálicos terminales; pertenece a la familia de siglecs.

siglec: Miembro de una familia de lectinas de la superficie celular, lectinas tipo Ig que unen ácido siálico (sialic acid binding *Ig*-like *lec*tins), con múltiples dominios tipo inmunoglobulina; se unen a estructuras de la superficie que contienen ácido siálico.

simbiontes: Dos o más organismos que son mutuamente interdependientes; normalmente viven en asociación física.

sintasas: Enzimas que catalizan reacciones de condensación en las que no se requiere un nucleósido trifosfato como fuente de energía.

sintenia: Orden conservado de los genes a lo largo de los cromosomas de diferentes especies.

sintetasas: Enzimas que catalizan reacciones de condensación utilizando ATP u otro nucleósido trifosfato como fuente de energía.

sistema: Conjunto aislado de materia; toda la materia restante del universo que no es la del sistema se denomina entorno.

sistema abierto: Sistema que intercambia materia y energía con su entorno. *Véase también* sistema.

sistema cerrado: Sistema que no intercambia ni materia ni energía con el entorno. *Véase también* sistema.

sistema de señalización de dos componentes: Sistemas de transducción de señal encontrado en bacterias y en plantas, compuesto por un receptor His quinasa que fosforila un residuo His interno cuando está ocupado por su ligando. Cataliza entonces la transferencia de fosforilo a un segundo componente, el regulador de respuesta, el cual, cuando está fosforilado, altera el rendimiento del sistema.

sistema DNA replicasa: El complejo completo de enzimas y proteínas especializadas requeridos en la replicación biológica del DNA.

sistema multienzimático: Grupo de enzimas relacionados que participan en una vía metabólica dada.

sitio activo: Región de la superficie de un enzima que fija la molécula de sustrato y la transforma catalíticamente; también se conoce como sitio catalítico.

sitio alostérico: Sitio específico en la superficie de una molécula enzimática alostérica al que se une la molécula moduladora o efectora.

sitio catalítico: *Véase* sitio activo.

sitio de fijación (unión): Hendidura o bolsa en una proteína a la que se fija un ligando.

sitio identificado por secuencia (STS): Cualquier secuencia que se ha localizado dentro de un cromosoma y/o clones procedentes del mismo.

solución molar: Un mol de soluto disuelto en agua dando un volumen total de 1.000 ml.

sonda: Fragmento de ácido nucleico marcado que contiene una secuencia nucleotídica complementaria a un gen o secuencia genómica que uno desea detectar en un experimento de hibridación.

STR: *Véase* repetición corta en tándem.

superenrollamiento: Torsión de una molécula helicoidal (enrollada sobre sí misma); espiral enrollada.

superenrollamiento del DNA: Arrollamiento del DNA sobre sí mismo, generalmente como resultado del giro, desenrollamiento a sobreenrollamiento de la hélice de DNA.

supresor sin sentido: Mutación, normalmente en el gen de un tRNA, que hace que un aminoácido se inserte en un polipéptido en respuesta a un codón de terminación.

sustitución conservadora: Sustitución de un residuo aminoácido en un polipéptido por otro residuo con propiedades parecidas; por ejemplo, sustitución de Glu por Asp.

sustrato: Compuesto específico sobre el que actúa un enzima.

Svedberg (S): Unidad de medida de la velocidad a la que sedimenta una partícula en un campo centrífugo.

t

tampón: Sistema capaz de resistir cambios de pH y que consiste en un par ácido-base conjugados en el que la proporción entre aceptor y dador de protones está próxima a la unidad.

tejido adiposo: Tejido conjuntivo especializado en el almacenaje de grandes cantidades de triacilgliceroles. *Véase también* tejido adiposo marrón; tejido adiposo blanco.

tejido adiposo blanco (WAT): Tejido adiposo no termogénico rico en triacilgliceroles almacenados y movilizados en respuesta a señales hormonales. La transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial está estrechamente acoplada a la síntesis de ATP. *Compárese* con tejido adiposo marrón.

tejido adiposo marrón (BAT): Tejido adiposo termogénico rico en mitocondrias que contienen la proteína desacoplante termogenina, que desacopla la transferencia electrónica a través de la cadena respiratoria de la síntesis de ATP. *Compárese* con tejido adiposo blanco.

telómero: Estructura de ácido nucleico especializada que se encuentra en los extremos de los cromosomas eucarióticos lineales.

teoría quimiosmótica: Teoría según la cual la energía generada en las reacciones de transferencia electrónica se almacena temporalmente en forma de diferencia transmembrana de carga y pH, la cual propulsa posteriormente la formación de ATP en la fosforilación oxidativa y en la fotofosforilación.

termogénesis: Generación biológica de calor por la actividad muscular (temblor), fosforilación oxidativa desacoplada o por el funcionamiento de ciclos inútiles.

termogenina: Proteína de la membrana mitocondrial interna del tejido adiposo marrón que permite el transporte de protones transmembrana cortocircuitando el uso normal de los protones para impulsar la síntesis de ATP y disipando la energía de la oxidación de sustratos en forma de calor. También se denomina proteína desacopladora (UCP).

terpenos: Hicrocarburos orgánicos o derivados hidrocarbonados construidos a partir de unidades de isopreno repetidas. Producen aromas y sabores de productos vegetales.

tetrahidrobiopterina: Forma coenzimática reducida de la biopterina.

tetrahidrofolato: Forma coenzimática activa, reducida, de la vitamina folato.

tiamina pirofosfato (TPP): Forma coenzimática activa de la vitamina B_1; interviene en reacciones de transferencia de aldehído.

tilacoide: Cisterna cerrada, o disco, formado por las membranas internas de los cloroplastos que son portadoras de pigmentos.

tioéster: Éster de un ácido carboxílico con un tiol o mercaptano.

tipo salvaje: Genotipo o fenotipo normal (sin mutar).

tocoferoles: Formas de la vitamina E.

topoisomerasas: Enzimas que introducen superenrollamientos positivos o negativos en dúplex circulares cerrados de DNA.

topoisómeros: Diferentes formas de una molécula de DNA circular cerrada covalentemente que difieren sólo en el número de enlace.

topología: Estudio de las propiedades de un objeto que no cambian bajo deformaciones continuas tales como por ejemplo la torsión o el doblamiento.

toxinas: Proteínas producidas por algunos organismos y tóxicas para otras especies.

TPP: *Véase* tiamina pirofosfato.

traducción: Proceso en el que la información genética presente en una molécula de mRNA especifica la secuencia de aminoácidos durante la síntesis de proteínas.

transaminación: Transferencia enzimática de un grupo amino desde un α-aminoácido a un α-cetoácido.

transaminasas: *Véase* aminotransferasas.

transcripción: Proceso enzimático mediante el cual la información genética contenida en una hebra de DNA se utiliza para especificar una secuencia de bases complementaria en una cadena de mRNA.

transcriptasa inversa: DNA polimerasa dirigida por RNA de los retrovirus; capaz de sintetizar DNA complementario a un RNA.

transcriptoma: Conjunto completo de transcritos de RNA presentes en una célula o tejido determinados en condiciones específicas.

transcrito primario: Producto RNA inmediato de la transcripción antes de cualquier reacción de maduración postranscripción.

transducción: (1) Generalmente, la conversión de energía o información de una forma a otra. (2) Transferencia de información genética de una célula a otra mediante un vector vírico.

transducción de señal: Proceso mediante el que una señal extracelular (química, mecánica o eléctrica) se amplifica y convierte en una respuesta celular.

transferasa terminal: Enzima que cataliza la adición de residuos nucleotídicos de una sola clase al extremo 3′ de cadenas de DNA.

transferencia electrónica: Movimiento de electrones desde un dador electrónico a un aceptor electrónico especialmente desde sustratos al oxígeno vía transportadores de la cadena respiratoria (de transferencia electrónica).

transferencia Southern: Procedimiento de hibridación de DNA en el que se detectan uno o varios fragmentos específicos de DNA en una población amplia por hibridación a una sonda complementaria de ácido nucleico marcado.

transformación: Introducción de un DNA exógeno en una célula que hace que la célula adquiera un nuevo fenotipo.

transgénico: Organismo que tiene genes de otro organismo incorporados dentro de su genoma como resultado de procedimientos de recombinación de DNA.

translocasa: (1) Enzima que cataliza el transporte a través de membrana. (2) Enzima que produce un desplazamiento, tal como el desplazamiento de un ribosoma a lo largo de un mRNA.

transpiración: Paso de agua desde las raíces de una planta a la atmósfera vía el sistema vascular y los estomas de las hojas.

transportador ABC: Miembro de una numerosa familia de transportadores con secuencias que constituyen secuencias de fijación de ATP (*A*TP-*B*inding *C*assettes). Estos transportadores desplazan un gran número de sustratos entre los que se encuentran iones inorgánicos, lípidos y medicamentos apolares hacia el exterior y a través de la membrana plasmática utilizando ATP como fuente de energía.

transportador electrónico: Proteína, tal como una flavoproteína o un citocromo, que puede ganar y perder reversiblemente electrones; funciona en la transferencia de electrones desde nutrientes orgánicos al oxígeno u otro aceptor terminal.

transportadores: Proteínas que abarcan una membrana y transportan nutrientes específicos, metabolitos, iones o proteínas a través de la membrana; a veces denominadas permeasas.

transporte activo: Transporte de un soluto a través de una membrana en la dirección de concentración creciente y que requiere energía.

transporte de membrana: Movimiento de un soluto polar a través de una membrana vía una proteína de membrana específica (transportador).

transporte simple (uniport): Sistema de transporte que sólo lleva un soluto en contraposición al cotransporte.

transposición: Traslado de un gen o conjunto de genes desde un sitio en el genoma a otro.

transposición del DNA: *Véase* transposición.

transposón (elemento transponible): Segmento de DNA que se puede trasladar desde una posición a otra en el genoma.

triacilglicerol: Éster del glicerol con tres moléculas de ácido graso; también denominado triglicérido o grasa neutra.

triosa: Azúcar sencillo con un esqueleto que contiene tres átomos de carbono.

tRNA: *Véase* RNA de transferencia.

trombocitos: *Véase* plaquetas.

tromboxanos: Clase de moléculas procedentes del araquidonato y que intervienen en la agregación plaquetaria durante la coagulación de la sangre.

Tyr quinasa de receptor (RTK): Gran familia de proteínas de la membrana plasmática con sitios de unión de ligando en el dominio extracelular, una sola hélice transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad Tyr quinasa controlada por el ligando extracelular.

U

ubiquitina: Proteína pequeña muy conservada que señala una proteína intracelular para su degradación por los proteasomas. Varias moléculas de ubiquitina se unen covalentemente en tándem a un residuo Lys en la proteína diana por un enzima ubiquitinante específico.

ureotélico: Que excreta el exceso de nitrógeno en forma de urea.

uricotélico: Que excreta el exceso de nitrógeno en forma de urato (ácido úrico).

V

V_{max}: Velocidad máxima de una reacción enzimática cuando el sitio de fijación está saturado con sustrato.

variación de energía libre (ΔG): Cantidad de energía libre desprendida (ΔG negativa) o absorbida (ΔG positiva) en una reacción a temperatura y presión constantes.

variación de energía libre estándar ($\Delta G°$): Variación de energía libre de una reacción que tiene lugar en condiciones estándar: temperatura 298 K; presión, 1 atm, o 101,3 kPa y todos los solutos a concentración 1 M. $\Delta G'°$ denota la variación de energía libre estándar a pH 7,0 en agua 55,5 M.

variación de entalpía (ΔH): Para una reacción es aproximadamente igual a la diferencia entre la energía utilizada para romper unos enlaces y la energía ganada en la formación de otros nuevos.

vector: Molécula de DNA que se replica autónomamente en una célula huésped a la que se puede cortar y empalmar un segmento de DNA para permitir su replicación; por ejemplo un plásmido o un cromosoma artificial.

vector de expresión: *Véase* vector.

vector lanzadera: Vector de DNA recombinante que se puede replicar en dos o más especies diferentes de huésped. *Véase también* vector.

vector vírico: DNA vírico alterado de modo que puede actuar como vector para DNA recombinante.

vectorial: Se refiere a una reacción enzimática o proceso de transporte en el que la proteína tiene una orientación específica en una membrana biológica de tal manera que el sustrato es trasladado de un lado de la membrana al otro lado durante su conversión en producto.

vida media: Tiempo necesario para la desaparición o desintegración de la mitad de un componente dado de un sistema.

virión: Partícula vírica.

virus: Complejo de ácido nucleico-proteína autorreplicante e infeccioso que requiere una célula huésped intacta para su replicación; su genoma puede ser DNA o RNA.

vitamina: Sustancia orgánica requerida en pequeñas cantidades en la dieta de algunas especies; generalmente funciona como componente de un coenzima.

Z

zimógeno: Precursor inactivo de un enzima; por ejemplo, pepsinógeno precursor de la pepsina.

zwitterion: Ión dipolar con cargas positiva y negativa separadas en el espacio.

Créditos

Modelado molecular

GRÁFICOS MOLECULARES Salvo indicación contraria, todos los gráficos moleculares fueron producidos por Jean-Yves Sgro, Ph.D., o H. Adam Steinberg, de la Universidad de Wisconsin-Madison, Departamento de Bioquímica.

COORDENADAS ATÓMICAS: Salvo indicación contraria todas las coordenadas atómicas se obtuvieron del Protein Data Bank en el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, www.rcsb.org/pdb/. Véase Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242; Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J.B., Meyer, E.F., Jr., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T., & Tasumi, M. (1977) Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112, 535; y Abola, E.E., Bernstein, F.C., Bryant, S.H., Koetzle, T.F., & Weng, J. (1987) Protein Data Bank. En *Crystallographic Databases—Information Content, Software Systems, Scientific Applications* (Allen, F.H., Bergerhoff, G., & Sievers, R., eds), Data Commission of the International Union of Crystallography, Bonn, p. 107.

Algunas estructuras (mencionadas más adelante) se generaron utilizando Sybyl 6.2, Tripos Inc., www.tripos.com, o PyMOL, pymol.sourceforge.net.

CAPÍTULO 1 **p. 1** François Jacob (1970) *The Logic of Life: A History of Heredity*, Pantheon Books, Inc., New York, 1973; publicado originalmente (1970) como *La logique du vivant: une histoire de l'hérédité*, Editions Gallimard, Paris; **Figura 1–1a** Ron Boardman/Frank Lane Agency/Corbis; **Figura 1–1b** W. Perry Conway/Corbis; **Figura 1–1c** Karen Tweedy-Holmes/Corbis; **Figura 1–2** The Bridgeman Art Library; **Figura 1–4** Adaptada de Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221, Fig. 4; **Figura 1–6 (arriba izquierda)** T. J. Beveridge/Biological Photo Service; **(arriba derecha, abajo izquierda)** Biological Photo Service; **(abajo derecha)** Norma J. Lange/Biological Photo Service; **Figura 1–8** Adaptada de Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J.D. (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2nd edn, Garland Publishing, Inc., New York, pp. 165–166; **Figura 1–9a** Cortesía de Invitrogen; **Figura 1–9b** Dr. Alexey Khodjakov, Wadsworth Center, New York State Department of Health; **Figura 1–11** Adaptada de Becker, W.M. & Deamer, D.W. (1991) *The World of the Cell*, 2nd edn, Fig. 2–15, Benjamin/ Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA; **Figura 1–16** Acetil-CoA obtenida de PDB ID 1DM3, Modis, Y. & Wierenga, R.K. (2000) Crystallographic analysis of the reaction pathway of *Zoogloea ramigera* biosynthetic thiolase. *J. Mol. Biol.* 297, 1171; **Figura 1–20** Adaptada de Carroll, F. (1998) *Perspectives on Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, Brooks/Cole Publishing Co., Pacific Grove, CA, p. 63; **Recuadro 1–2** (Pasteur) The Granger Collection; **Figura 1–22** PDB ID 1AKX, Brodsky, A.S. & Williamson, J.R. (1997) Solution structure of the HIV-2 Tar-argininamide complex. *J. Mol. Biol.* 267, 624; **p. 22** (Gibbs) Historical Pictures Service/ Stock Montage; **Figura 1–29a** Erich Lessing/Art Resource, New York; **Figura 1–29b** Dr. Gopal Murti-CNRI/Phototake New York; **p. 29** Theodosius Dobzhansky (1973) Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. *The American Biology Teacher* (marzo) 35, 125–129.

CAPÍTULO 2 **p. 43** Linus Pauling (1939) *The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals: An Introduction to Modern Structural Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, NY; **Figura 2–9** PDB ID 1A3N, Tame, J. & Vallone, B. (1998) Deoxy human hemoglobin (cita original no disponible); **Figura 2–10** Adaptada de Nicolls, P. (2000) Introduction: the biology of the water molecule. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 987, Fig. 6a (redibujada a partir de información en el PDB y un archivo Kinemage publicado por Martinez, S.E., Huang, D., Ponomarev, M., Cramer, W.A., & Smith, J.L. (1996) The heme redox center of chloroplast cytochrome *f* is linked to a buried five-water chain. *Protein Sci.* 5, 1081); **Recuadro 2–1** J. B. S. Haldane (1928) *Possible Worlds*, Harper and Brothers, New York y London, pp. 113–126; **p. 66** Jon Bertsch/Visuals Unlimited.

CAPÍTULO 3 **p. 71** J. J. Berzelius (1838) Carta a J. Mulder. En H. B. Vickery (1950) The origin of the word protein. *Yale Journal of Biology and Medicine* 22, 387–393; **Figura 3–1a** Runk/Schoenburger/Grant Heilman Photography; **Figura 3–1b** Bill Longcore/Photo Researchers; **Figura 3–1c** Animals Animals; **p. 72** (Dayhoff) Cortesía de Ruth E. Dayhoff; **Figura 3–18b** Julia Cox, University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry; **Figura 3–21b** Patrick H. O'Farrell, University of California Medical Center, San Francisco, Department of Biochemistry and Biophysics; **Figura 3–23** PDB ID 1HGA, Liddington, R., Derewenda, Z., Dodson, E., Hubbard, R., & Dodson, G. (1992) High resolution crystal structures and comparisons of T state deoxyhaemoglobin and two liganded T-state haemoglobins: T(α-oxy) haemoglobin and T(met)haemoglobin. *J. Mol. Biol.* 228, 551; **p. 94** (Sanger) UPI/Corbis-Bettmann; **Recuadro 3–2 Figuras 1, 2** Adaptadas de Mann, M. & Wilm, M. (1995) Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* 20, 219; **p. 101** (Merrifield) Corbis/Bettmann; **Recuadro 3–3 Figura 1** Datos de secuencia para **(a)** del documento ID PDOC00017 y para **(b)** del documento ID PDOC00018, www.expasy.org/prosite, Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Pagni, M., & Sigrist, C.J.A. (2006) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* 34, D227; WebLogo de http://weblogo.berkeley.edu, Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., & Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator, *Genome Res.* 14, 1188; **Figuras 3–30, 3–31, 3–32** Adaptadas de Gupta, R.S. (1998) Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1435, Figs 2, 7, 11, respectivamente; **Figura 3–33** Adaptada de Delsuc, F., Brinkmann, H., & Philippe, H. (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.* 6, 366; **p. 111, problema 11** Véase cita del Recuadro 3–3 Figura 1, documento ID PDOC00270.

CAPÍTULO 4 **p. 113** J. C. Kendrew et al. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181, 662–666; **Figura 4–1** PDB ID 6GCH, Brady, K., Wei, A., Ringe, D., & Abeles, R.H. (1990) Structure of chymotrypsin-trifluoromethyl ketone inhibitor complexes: comparison of slowly and rapidly equilibrating inhibitors. *Biochemistry* 29, 7600; glycine coordinates from Sybyl; **p. 115** (Pauling) Corbis/Bettmann; (Corey) AP/Wide World Photos; **Figura 4–3** Adaptada de Creighton, T.E. (1984) *Proteins*, p. 166. © 1984 by W. H. Freeman and Company. Reimpresa con permiso; **Figura 4–4b,c** PDB ID 4TNC, Satyshur, K.A., Rao, S.T., Pyzalska, D., Drendel, W., Greaser, M., & Sundaralingam, M. (1988) Refined structure of chicken skeletal muscle troponin C in the two-calcium state at 2-angstroms resolution. *J. Biol. Chem.* 263, 1628; **Figura 4–8a** Véase cita de la Figura 4–3; **Figura 4–8b** Cortesía de Hazel Holden, University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry and Enzyme Institute; **Figura 4–11** PDB ID 1CGD (modificada), Bella, J., Brodsky, B., & Berman, H.M. (1995) Hydration structure of a collagen peptide. *Structure* 3, 893; **Figura 4–12** Science Source/Photo Researchers; **p. 126** Ethel Wedgwood (1906) *The Memoirs of the Lord of Joinville: A New English Version*, E. P. Dutton and Company, New York; (Lind) Cortesía del Royal College of Physicians of Edinburgh; **Figura 4–13a** PDB ID 1SLK (modelo), Fossey, S.A., Nemethy, G., Gibson, K.D., & Scheraga, H.A. (1991) Conformational energy studies of β-sheets of model silk fibroin peptides: I. Sheets of poly(Ala-Gly) chains. *Biopolymers* 31, 1529; **Figura 4–13b** Dr. Dennis Kunkel/Phototake NYC; **Figura 4–15** PDB ID 1MBO; Phillips, S.E.V. (1980) Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* 142, 531; **Figura 4–17b** PDB ID 7AHL; Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., & Gouaux, J.E. (1996) Structure of staphylococcal α hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274, 1859; **Recuadro 4–5 Figura 1a,b,c** George N. Phillips, Jr., University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry; **Recuadro 4–5 Figura 1d** PDB ID 2MBW; Brucker, E.A., Olson, J.S., Phillips, G.N., Jr., Dou, Y., & Ikeda-Saito, M. (1996) High resolution crystal structures of the deoxy-, oxy-, and aquomet- forms of cobalt myoglobin. *J. Biol. Chem.* 271, 25,419; **Recuadro 4–5 Figuras 2, 3a** Volkman, B.F., Alam, S.L., Satterlee, J.D., & Markley, J.L. (1998) Solution structure and backbone dynamics of component IV-glycera dibranchiata monomeric hemoglobin-CO. *Biochemistry* 37, 10,906; **Recuadro 4–5 Figura 3b,c** Creada por Brian Volkman, National Magnetic Resonance Facility at Madison, utilizando MOLMOL; PDB ID 1VRF **(b)** y 1VRE **(c)**, véase cita para Recuadro 4–5 Figuras 2, 3a; **Figura 4–18** PDB ID 4TNC, véase cita para Figura 4–4b,c; **Figura 4–19c** PDB ID 1DNP, Park, H.W., Kim, S.T., Sancar, A., & Deisenhofer, J. (1995) Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* 268, 1866; **Figura 4–20** PDB ID 1PKN, Larsen, T.M., Laughlin, L.T., Holden, H.M., Rayment, I., & Reed, G.H. (1994) Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn^{2+}, K^+, and pyruvate. *Biochemistry* 33, 6301; **Figura 4–21 (todo α)** PDB ID 1A06, Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., & Kobayashi, K. (1999) Crystal structure of human serum albumin at 2.5 angstrom resolution. *Protein Eng.* 12, 439; PDB ID 1BCF, Frolow, F., Kalb (Gilboa), A.J., & Yariv, J. (1994) The structure of a unique, two-fold symmetric, haem-binding site. *Nat. Struct. Biol.* 1, 453;

PDB ID 1GAI, Aleshin, A.E., Stoffer, B., Firsov, L.M., Svensson, B., & Honzatko, R.B. (1996) Crystallographic complexes of glucoamylase with maltooligosaccharide analogs: relationship of stereochemical distortions at the nonreducing end to the catalytic mechanism. *Biochemistry* 35, 8319; PDB ID 1ENH, Clarke, N.D., Kissinger, C.R., Desjarlais, J., Gilliland, G.L., & Pabo, C.O. (1994) Structural studies of the engrailed homeodomain. *Protein Sci.* 3, 1779; **(todo β)** PDB ID 1LXA, Raetz, C.R.H. & Roderick, S.L. (1995) A left-handed parallel β-helix in the structure of UDP *N*-acetylglucosamine acyltransferase. *Science* 270, 997; PDB ID 1PEX, Gomis-Ruth, F.X., Gohlke, U., Betz, M., Knauper, V., Murphy, G., Lopez-Otin, C., & Bode, W. (1996) The helping hand of collagenase-3 (Mmp-13): 2.7 Å crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain. *J. Mol. Biol.* 264, 556; PDB ID 1CD8, Leahy, D.J., Axel, R., & Hendrickson, W.A. (1992) Crystal structure of a soluble form of the human T cell co-receptor Cd8 at 2.6 angstroms resolution. *Cell* 68, 1145; **(α/β)** PDB ID 1DEH, Davis, G.J., Stone, C.J., Bosron, W.F., & Hurley, T.D. (1996) X-ray structure of human $\beta_3\beta_3$ alcohol dehydrogenase: the contribution of ionic interactions to coenzyme binding. *J. Biol. Chem.* 271, 17,057; PDB ID 1DUB, Engel, C.K., Mathieu, M., Zeelen, J.P., Hiltunen, J.K., & Wierenga, R.K. (1996) Crystal structure of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase at 2.5 angstroms resolution: a spiral fold defines the CoA-binding pocket. *EMBO J.* 15, 5135; PDB ID 1PFK, Shirakihara, Y. & Evans, P.R. (1988) Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* 204, 973; **(α + β)** PDB ID 2PIL, Forest, K.T., Dunham, S.A., Koomey, M., & Tainer, J.A. (1999) Crystallographic structure of phosphorylated pilin from *Neisseria*: phosphoserine sites modify type IV pilus surface chemistry and morphology. *Mol. Microbiol.* 31, 743; PDB ID 1SYN, Stout, T.J. & Stroud, R.M. (1996) The complex of the anti-cancer therapeutic, BW1843U89, with thymidylate synthase at 2.0 Å resolution: implications for a new mode of inhibition. *Structure* 4, 67–77; PDB ID 1EMA, Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., & Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392; **p. 138** (Perutz y Kendrew) Corbis/Hulton Deutsch Collection; **Figura 4–22** PDB ID 2HHB, Fermi, G., Perutz, M.F., Shaanan, B., & Fourme, R. (1984) The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* 175, 159; **Figura 4–24a** PDB ID 2PLV, Filman, D.J., Syed, R., Chow, M., Macadam, A.J., Minor, P.D., & Hogle, J.M. (1989) Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.* 8, 1567, as rendered in the VIPER database, Shepherd, C.M., Borelli, I.A., Lander, G., Natarajan, P., Siddavanahalli, V., Bajaj, C., Johnson, J.E., Brooks, C.L. III, & Reddy, V.S. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, D386; **Figura 4–24b** Science Source/Photo Researchers; PDB ID 1VTM, Pattanayek, R. & Stubbs, G. (1992) Structure of the U2 strain of tobacco mosaic virus refined at 3.5 angstroms resolution using x-ray fiber diffraction. *J. Mol. Biol.* 228, 516; **Figura 4–25a** Datos de Sendak, R.A., Rothwarf, D.M., Wedemeyer, W.J., Houry, W.A., & Scheraga, H.A. (1996) Kinetic and thermodynamic studies of the folding/unfolding of a tryptophan-containing mutant of ribonuclease A. *Biochemistry* 35, 12,978; Nishii, I., Kataoka, M., & Goto, Y. (1995) Thermodynamic stability of the molten globule states of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* 250, 223; **Figura 4–25b** Datos de Houry, W.A., Rothwarf, D.M., & Scheraga, H.A. (1996) Circular dichroism evidence for the presence of burst-phase intermediates on the conformational folding pathway of ribonuclease A. *Biochemistry* 35, 10,125; **Figura 4–27** Cortesía del Yong Duan y Peter A. Kollman, University of California, San Francisco, Department of Pharmaceutical Science; **Figura 4–28** Adaptada de Wolynes, P.G., Onuchic, J.N., & Thirumalai, D. (1995) Navigating the folding routes. *Science* 267, 1619; **Figura 4–30b** PDB ID 1AON, Xu, Z., Horwich, A.L., & Sigler, P.B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex. *Nature* 388, 741; **Figura 4–31a** Adaptada de Selkoe, D.J. (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426, 903, Fig. 1; **Figura 4–31b** PDB ID 1IYT, Crescenzi, O., Tomaselli, S., Guerrini, R., Salvadori, S., D'Ursi, A.M., Temussi, P.A., & Picone, D. (2002) Solution structure of the Alzheimer amyloid β-peptide (1–42) in an apolar microenvironment: similarity with a virus fusion domain. *Eur. J. Biochem.* 269, 5642; **Figura 4–31c** PDB ID 2BEG, Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., & Riek, R. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid-β(1–42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 17,342; **Recuadro 4–6 Figura 1** Stephen J. DeArmond; **Recuadro 4–6 Figura 2** PDB ID 1QM0, Zahn, R., Liu, A., Lührs, T., Riek, R., von Schroetter, C., García, F.L., Billeter, M., Calzolai, L., Wider, G., & Wüthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 145.

CAPÍTULO 5 **p. 153** Emil Fischer (1906) Untersuchen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (Estudios de aminoácidos, polipéptidos y proteínas). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin* 39, 530; **Figura 5–1c** Hemo obtenido de PDB ID 1CCR, Ochi, H., Hata, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Sakurai, T., Aihara, S., & Morita, Y. (1983) Structure of rice ferricytochrome *c* at 2.0 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* 166, 407; **Figuras 5–3, 5–5c, 5–6 (izquierda)** PDB ID 1MBO, Phillips, S.E.V. (1980) Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* 142, 531; **Figuras 5–6 (derecha), 5–8, 5–9a, 5–10 (estado T), 5–11 (estado T)** PDB ID 1HGA; Liddington, R., Derewenda, Z., Dodson, E., Hubbard, R., & Dodson, G. (1992) High resolution crystal structures and comparisons of T state deoxyhaemoglobin and two liganded T-state haemoglobins: T(α-oxy)haemoglobin and T(met)haemoglobin. *J. Mol. Biol.* 228, 551; **Figuras 5–10 (estado R), 5–11 (estado R)** PDB ID 1BBB, Silva, M.M., Rogers, P.H., & Arnone, A. (1992) A third quaternary structure of human hemoglobin a at 1.7-angstroms resolution. *J. Biol. Chem.* 267, 17,248; en la Fig. 5–11 ha sido modificado para representar O_2 en vez de CO; **Recuadro 5–1 Figura 1** Adaptada de Coburn, R.F., Forster, R.E., & Kane, P.B. (1965) Considerations of the physiological variables that determine the blood carboxyhemoglobin concentration in man. *J. Clin. Invest.* 44, 1899; **Recuadro 5–1 Figura 2** Adaptada de Roughton, F.J.W. & Darling, R.C. (1944) The effect of carbon monoxide on the oxyhemoglobin dissociation curve. *Am. J. Physiol.* 141, 17; **Figura 5–18** PDB ID 1HGA; véase cita para la Figura 5–6 (derecha). Coordinates for 2,3-bisphosphoglycerate obtained from Paul Reisberg, Wellesley College, Department of Chemistry; **Figura 5–19a** Andrew Syred/Science Photo Library/Custom Medical Stock Photo; **Figura 5–19b** Custom Medical Stock Photo; **Figura 5–21b** PDB ID 1IGT, Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W., & McPherson, A. (1997) Refined structure of an intact IgG2A monoclonal antibody. *Biochemistry* 36, 1581; **Figura 5–25a** PDB ID 1GGC, Stanfield, R.L., Takimoto-Kamimura, M., Rini, J.M., Profy, A.T., & Wilson, I.A. (1993) Major antigen-induced domain rearrangements in an antibody. *Structure* 1, 83; **Figura 5–25b,c** PDB ID 1GGI, Rini, J.M., Stanfield, R.L., Stura, E.A., Salinas, P.A., Profy, A.T., & Wilson, I.A. (1993) Crystal structure of an human immuno-deficiency virus type 1 neutralizing antibody, 50.1, in complex with its V3 loop peptide antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6325; **p. 173** (Kohler y Milstein) Corbis/UPI/Bettmann; **Figura 5–26b** State of Wisconsin Laboratory of Hygiene, Madison, WI; **Figura 5–26c** Son, M., Gundersen, R.E., & Nelson, D.L. (1993) A second member of the novel Ca^{2+}-dependent protein kinase family from *Paramecium tetraurelia*: purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 268, 5940; **Figura 5–27a** David Shotton, University of Oxford, Department of Zoology; **Figura 5–27c** Cortesía de Ivan Rayment, University of Wisconsin–Madison, Enzyme Institute and Department of Biochemistry (véase también PDB ID 2MYS, Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., & Holden, H.M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261, 50); **Figura 5–28a** Eisaku Katayama, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Department of Fine Morphology; **Figura 5–28b** Roger Craig, University of Massachusetts Medical School; **Figura 5–28c** véase cita para la Figura 5–27c; **Figura 5–29b,c** James E. Dennis/Phototake NYC.

CAPÍTULO 6 **p. 183** J. B. S. Haldane (1930) *Enzymes*, Longmans, Green & Co., London, p. 182; William P. Jencks (1975) Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the Circe effect. *Advances in Enzymology* 43, 219–410; **p. 184** (Buchner) Science Photo Library/Photo Researchers; (Sumner and Haldane) AP/Wide World Photos; **Figura 6–1** PDB ID 7GCH, Brady, K., Wei, A., Ringe, D., & Abeles, R.H. (1990) Structure of chymotrypsin-trifluoromethyl ketone inhibitor complexes: comparison of slowly and rapidly equilibrating inhibitors. *Biochemistry* 29, 7600; **Figura 6–4** PDB ID 1RA2, Sawaya, M.R. & Kraut, J. (1997) Loop and subdomain movements in the mechanism of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: crystallographic evidence. *Biochemistry* 36, 586; **p. 195** (Michaelis) Rockefeller University Archive Center; (Menten) Cortesía de Dorothy C. Craig; **Figura 6–18b,c,d** PDB ID 7GCH, véase cita para la Figura 6–1; **Figura 6–22a** PDB ID 2YHX, Anderson, C.M., Stenkamp, R.E., & Steitz, T.A. (1978) Sequencing a protein by x-ray crystallography: II. Refinement of yeast hexokinase B coordinates and sequence at 2.1 angstroms. *J. Mol. Biol.* 123, 15; **Figura 6–22b** PDB ID 1HKG, Steitz, T.A., Shoham, M., & Bennett, W.S., Jr. (1981) Structural dynamics of yeast hexokinase during catalysis. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 293, 43; coordenadas de la glucosa (GLC) transformadas de PDB ID 1GLK, St. Charles, R., Harrison, R.W., Bell, G.I., Pilkis, S.J., & Weber, I.T. (1994) Molecular model of human beta-cell glucokinase built by analogy to the crystal structure of yeast hexokinase B. *Diabetes* 43, 784; **Figura 6–23b** PDB ID 1ONE, Larsen, T.M., Wedekind, J.E., Rayment, I., & Reed, G.H. (1996) A carboxylate oxygen of the substrate bridges the magnesium ions at the active site of enolase: structure of the yeast enzyme complexed with the equilibrium mixture of 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* 35, 4349; **Figura 6–24a** PDB ID 1LZE, Maenaka, K., Matsushima, M., Song, H., Sunada, F., Watanabe, K., & Kumagai, I. (1995) Dissection of protein-carbohydrate interactions in mutant hen egg-white lysozyme complexes and their hydrolytic activity. *J. Mol. Biol.* 247, 281; **Figura 6–25a,b** PDB ID 1H6M, Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R., & Withers, S.G. (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate *Nature* 412, 835; **Recuadro 6–3 Figura 1** Adaptada de Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd edn, p. 318.

© 1977, 1985 por W. H. Freeman and Company. Reimpresa con permiso; **Figura 6–32** PDB ID 2AT2, Stevens, R.C., Reinisch, K.M., & Lipscomb, W.N. (1991) Molecular structure of *Bacillus subtilis* aspartate transcarbamoylase at 3.0 angstroms resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6087. Coordenadas de simetría relacionadas proporcionadas por Raymond C. Stevens, University of California, Berkeley.

CAPÍTULO 7 p. 235 E. B. White (1977) Coon Tree. En *Essays of E. B. White*, HarperCollins, Perennial Classics edn, New York, 1999, pp. 47–48; **Figura 7–16** Cortesía de Jack Scheper, Floridata.com; **Figura 7–17b** Leroy Somon/Visuals Unlimited; **Figura 7–19** Cortesía de H.-J. Gabius y Herbert Kaltner, University of Munich, de una figura proporcionada por C.-W. von der Lieth, Heidelberg; **Figura 7–20b** PDB ID 1C58, Gessler, K., Uson, I., Takaha, T., Krauss, N., Smith, S.M., Okada, S., Sheldrick, G.M., & Saenger, W. (1999) V-Amylose at atomic resolution: x-ray structure of a cycloamylose with 26 glucose residues (cyclomaltohexaicosaose). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4246; **Figura 7–22** PDB ID 1HPN, Mulloy, B., Forster, M.J., Jones, C., & Davies, D.B. (1993) N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem. J.* 293, 849; **Figura 7–23** PDB ID 1E0O, Pellegrini, L., Burke, D.F., von Delft, F., Mulloy, B., & Blundell, T.L. (2000) Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 407, 1029; **Figura 7–25a** Adaptada de Häker, U., Nybakken, K., & Perrimon, N. (2005) Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 532; **Figuras 7–25b, 7–26** Adaptada de Turnbull, J., Powell, A., & Guimond, S. (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol.* 11, 75; **Figura 7–27 inserto** Cortesía de Laurel Ng. Reimpresa con permiso de Ng, L., Grodzinsky, A., Patwari, P., Sandy, J., Plaas, A.H.K., & Ortiz, C. (2003) Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 143, 242–257, Fig 7a izquierda; **Figura 7–32** R. M. Genta y D. Y. Graham, Veterans Affairs Medical Center, Houston, TX; **p. 260** (Barry, Warren) The Nobel Foundation; **Figura 7–33a,b** PDB ID 1M6P, Roberts, D.L., Weix, D.J., Dahms, N.M., & Kim, J.J. (1998) Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 93, 639; **Figura 7–34** Adaptada de una figura proporcionada por dr. C.-W. von der Lieth, Heidelberg, en Gabius, H.-J. (2000) Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. *Naturwissenschaften* 87, 108, Fig. 6; **Figura 7–35** Adaptada de Sharon, N. & Lis, H. (1993) Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* 268 (enero), 82; **Figura 7–37** Cortesía de Anne Dell. Reimpresa con permiso de Comelli, E.M., Head, S.R., Gilmartin, T., Whisenant, T., Haslam, S.M., North, S.J., Wong, N.-K., Kudo, T., Narimatsu, H., Esko, J.D., Drickamer, K., Dell, A., & Paulson, J.C. (2006) A focused microarray approach to functional glycomics: transcriptional regulation of the glycome. *Glycobiology* 16, 117–131, Fig. 3.

CAPÍTULO 8 p. 271 James D. Watson (1968) *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA*, Atheneum, New York; **p. 277** (Watson y Crick) Corbis/UPI/Bettmann; **Figura 8–12** Science Source/Photo Researchers; **p. 278** (Franklin) Science Photo Library/Photo Researchers; (Wilkins) Corbis/UPI/Bettmann; **Figuras 8–13b,c, 8–17** Coordenadas generadas por Sybyl; **Figura 8–20b** PDB ID 1BCE, Asensio, J.L., Brown, T., & Lane, A.N. (1998) Comparison of the solution structures of intramolecular DNA triple helices containing adjacent and non-adjacent CG.C+ triplets. *Nucleic Acids Res.* 26, 3677; **Figura 8–20d** Estructura teórica PDB ID 1QDG, Marathias, V.M., Wang, K.Y., Kumar, S., Swaminathan, S., & Bolton, P.H. (1996) Determination of the number and location of the manganese binding sites of DNA quadruplexes in solution by EPR and NMR in the presence and absence of thrombin. *J. Mol. Biol.* 260, 378; **Figura 8–22** Coordenadas generadas por Sybyl; **Figura 8–24** James, B., Olsen, G.J., Liu, J., & Pace, N.R. (1988) The secondary structure of ribonuclease P RNA, the catalytic element of a ribonucleoprotein enzyme. *Cell* 52, 19–26; **Figura 8–25a** PDB ID 1TRA, Westhof, E. & Sundaralingam, M. (1986) Restrained refinement of the monoclinic form of yeast phenylalanine transfer RNA: temperature factors and dynamics, coordinated waters, and base-pair propeller twist angles. *Biochemistry* 25, 4868; **Figura 8–25b** PDB ID 1MME, Scott, W.G., Finch, J.T., & Klug, A. (1995) The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell* 81, 991; **Figura 8–25c** PDB ID 1GRZ, Golden, B.L., Gooding, A.R., Podell, E.R., & Cech, T.R. (1998) A preorganized active site in the crystal structure of the *Tetrahymena* ribozyme. *Science* 282, 259; **Figura 8–27b** Adaptada de Marmur, J. & Doty, P. (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5, 109; **Figura 8–28** Ross B. Inman, University of Wisconsin–Madison, Department of Molecular Biology; **Figura 8–33c** Lloyd Smith, University of Wisconsin–Madison, Department of Chemistry; **Figura 8–34** Datos proporcionados por Lloyd Smith, University of Wisconsin–Madison, Department of Chemistry.

CAPÍTULO 9 p. 303 Emile Zuckerkandl y Linus Pauling (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* 8, 357–366; (Berg) Cortesía de Stanford Visual Art Services; (Boyer) Cortesía de Genentech, Inc.; (Cohen) Cortesía de Stanford Visual Art Services; **Figura 9–4** Elizabeth A. Wood, University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry; **Figura 9–15a** Cortesía de Kevin Strange y Michael Christensen, Vanderbilt University Medical Center, Department of Pharmacology; **Recuadro 9–1 Figura 1** Phil Borden/PhotoEdit; **Recuadro 9–1 Figura 2b** Cortesía de Carol Bingham, Promega Corporation; **p. 322** (Collins) Alex Wong/Newsmakers; (Venter) Mike Theiler/Reuters; **Figura 9–20** Adaptada de Wolfsberg, T.G., McEntyre, J., & Schuler, G.D. (2001) Guide to the draft human genome. *Nature* 409, 824, Fig. 1; **Figura 9–23** Cortesía de Patrick O. Brown, Stanford University School of Medicine, Department of Biochemistry; **Figura 9–24** Adaptada de Pandey, A. & Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837, Fig. 7; **Figura 9–29** Cortesía de Keith Wood, University of California, San Diego, Department of Biology; **Figura 9–30** De Fischhoff, D.A. & Bowdish, K.S. (1987) Insect tolerant transgenic tomato plants. *BioTechnology* 5, 807. Foto cortesía de David Fischhoff, Monsanto Company; **Figura 9–31a,b** Cortesía de Chris Boerboom, University of Wisconsin–Madison, Department of Agronomy; **Figura 9–33** Cortesía de Yorktown Technologies, LP, www.glofish.com.

CAPÍTULO 10 p. 343 Michel-Eugène Chevreul (1814) Chemical inquiries into the nature of several fatty substances, and particularly on their combinations with the alkalis. Of a new substance, called margarine, obtained from the soap made from the fat of pork and potash. *Philosophical Magazine* 44, 193; **Figuras 10–2a,b, 10–3** Coordenadas de Sybyl; **Figura 10–4a** Biological Photo Service; **Figura 10–4b** Cortesía de Howard Goodman, Harvard Medical School, Department of Genetics; **Figura 10–6b** William J. Weber/Visuals Unlimited; **p. 353** De Drabkin, D.L. (1958) *Thudichum: Chemist of the Brain*, University of Pennsylvania Press, debidas a Thudichum, J.L.W. (1898) *Briefe über öffentliche Gesundheitspflege ihre bisherigen Leistungen und heutigen Aufgaben*, F. Pietzcker, Tübingen; **Figura 10–14** Coordenadas de Sybyl; **Figura 10–17** Coordenadas de PDB a partir Dave Woodcock, Okanagan University College, Kelowna, British Columbia, Department of Chemistry; **Recuadro 10–2 Figura 2** Herbert A. Fischler, Isaac Albert Research Institute of the Kingsbrook Jewish Medical Center; **p. 358** (Vane, Bergström y Samuelsson) Ira Wyman/Sygma; **Figura 10–20b** Cortesía de Media Center, University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry; **p. 361** (Dam y Doisy) AP/Wide World Photos; **Figura 10–23** (cardenal) Dr. Dan Suda; (jilguero) Richard Day/VIREO; **Figura 10–25** Christie, W.W. (1996) Beginners' guide to mass spectrometry of fatty acids: 2. General purpose derivatives. *Lipid Technol.* 8, 64.

CAPÍTULO 11 p. 371 Robert Frost (1914) Mending Wall. En *North of Boston*, David Nutt, London; **Figura 11–1** Cortesía de J. D. Robertson; **Figura 11–5** Datos de Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* 294, 1; **Figura 11–7** Adaptada de Marchesi, V.T., Furthmayr, H., & Tomita, M. (1976) The red cell membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 45, 667; **Figura 11–9** PDB ID 2AT9, Mitsuoka, K., Hirai, T., Murata, K., Miyazawa, A., Kidera, A., Kimura, Y., & Fujiyoshi, Y. (1999) The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution. *J. Mol. Biol.* 286, 861; **Figura 11–10a** PDB ID 2B6O, Gonen, T., Cheng, Y., Sliz, P., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Harrison, S.C., & Walz, T. (2005) Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature* 438, 633; **Figura 11–10b** PDB ID 2BL2, Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A.G., & Walker, J.E. (2005) Structure of the rotor of the V-Type Na^+-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science* 308, 654; **Figura 11–12** PDB ID 1BL8, Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., & MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280, 69; PDB ID 1AF6, Wang, Y.F., Dutzler, R., Rizkallah, P.J., Rosenbusch, J.P., & Schirmer, T. (1997) Channel specificity: structural basis for sugar discrimination and differential flux rates in maltoporin. *J. Mol. Biol.* 272, 56; PDB ID 1QD5, Snijder, H.J., Ubarretxena-Belandia, I., Blaauw, M., Kalk, K.H., Verheij, H.M., Egmond, M.R., Dekker, N., & Dijkstra, B.W. (1999) Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* 401, 717; PDB ID 1QJ9, Vogt, J. & Schulz, G.E. (1999) The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals mechanisms of virulence. *Structure* 7, 1301; PDB ID 1PHO, Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N., & Rosenbusch, J.P. (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358, 727; **Figura 11–13** PDB ID 1FEP, Buchanan, S.K., Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., & Deisenhofer, J. (1999) Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* 6, 56; PDB ID 1QD5, Snijder, H.J., Ubarretxena-Belandia, I.,

Blaauw, M., Kalk, K.H., Verheij, H.M., Egmond, M.R., Dekker, N., & Dijkstra, B.W. (1999) Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* 401, 717; PDB ID 1MAL, Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F., & Rosenbusch, J.P. (1995) Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* 267, 512; **Figura 11–15** Heller, H., Schaefer, M., & Schulten, K. (1993) Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids, in the gel and in the liquid-crystal phases. *J. Phys. Chem.* 97, 8343; **Figura 11–18** Cortesía de Takahiro Fujiwara, Ken Ritchie, Hideji Murakoshi, Ken Jacobson, and Akihiro Kusumi; **Recuadro 11–1 Figura 2a** Cortesía de Daniel J. Müeller, Ueli Aebi y Andreas Engel, M. E. Müller Institute (MSB), Biozentrum, University of Basel; **Recuadro 11–1 Figura 2b** Cortesía de S. Scheuring, D. Fotiadis, C. Möller, S. A. Müller, A. Engel y D. J. Müeller; **Recuadro 11–1 Figura 2c** Cortesía de Daniel J. Müeller, Max-Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics; **Figura 11–20b** Adaptada de una micrografía cortesía de J. M. Edwardson, University of Cambridge, Department of Pharmacology; **Figura 11–21a** Cortesía de R. G. Parton. Reimpresa con permiso de Parton, R.G. & Simons, K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185–194, Fig. 1a; **Figura 11–23** Adaptada de Zimmerberg, J. & Kozlov, M.M. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 15; **Figura 11–24** Adaptada de Chen, Y.A. & Scheller, R.H. (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nature* 2, 98; **Figura 11–29a,c** Adaptada de Mueckler, M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219, 713; **Recuadro 11–2 Figura 1** Adaptada de Lienhard, F.E., Slot, J.W., James, D.E., & Mueckler, M.M. (1992) How cells absorb glucose. *Sci. Am.* 266 (Enero), 86; **Figura 11–35** PDB ID 1SU4, Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 angstrom resolution. *Nature* 405, 647; **Figura 11–36** Adaptada de Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 291; **p. 399** (Skou) Cortesía de Information Office, University of Aarhus, Denmark; **Figura 11–41** PDB ID 1L7V, Locher, K.P., Lee, A.T., & Rees, D.C. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296, 1091; **Recuadro 11–3 Figura 2** Tom Moninger, University of Iowa, Ames; **Figura 11–43a** PDB ID 1PVL, Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., & Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301, 610; **Figura 11–43b** PDB ID 2CFQ, Mirza, O., Guan, L., Verner, G., Iwata, S., & Kaback, H.R. (2006) Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H^+ symport in LacY. *EMBO J.* 25, 1177; **Figura 11–45** Coordenadas preparadas para The Virtual Museum of Minerals and Molecules, www.soils.wisc.edu/virtual_museum, by Phillip Barak, University of Wisconsin–Madison, Department of Soil Science, utilizando datos Neupert-Laves, K. & Dobler, M. (1975) The crystal structure of a K^+ complex of valinomycin. *Helv. Chim. Acta* 58, 432; **p. 404** (Agre) Cortesía de the Royal Swedish Academy of Sciences; **Figura 11–46a** PDB ID 2B5F, Tornroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R., & Kjellbom, P. (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439, 688; **Figura 11–46b** Adaptada de PDB ID 1J4N, Sui, H., Han, B.-G., Lee, J.K., Walian, P., & Jap, B.K. (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414, 872; **p. 407** (Neher, Sakmann) The Nobel Foundation; (MacKinnon) Cortesía de the Royal Swedish Academy of Sciences; **Figura 11–48a,b** PDB ID 1BL8, Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., & Mackinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280, 69; **Figura 11–48c** Adaptada de Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419, 37; **Figura 11–49** PDB ID 1J95, Zhou, M., Morais-Cabral, J.H., Mann, S., & MacKinnon, R. (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657; **Figura 11–50a,b,d** PDB ID 2A79, Long, S.B., Campbell, E.B., & MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^+ channel. *Science* 309, 897; **Figura 11–50c** Adaptada de Gandhi, C.S. & Isacoff, E.Y. (2005) Shedding light on membrane proteins. *Trends Neurosci.* 28, 476.

CAPÍTULO 12 **p. 419** Earl W. Sutherland (1971) Conferencia Nobel, www.nobel.se/medicine/laureates/1971/sutherland-lecture.html; **Recuadro 12–2 Figura 1** (Gilman) Office of News and Publications, The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas; (Rodbell) Cortesía de Andrew Rodbell; **Recuadro 12–2 Figura 2** PDB ID 5P21, Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W., & Wittinghofer, A. (1990) Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* 9, 2351; **Recuadro 12–2 Figura 3** Adaptada de Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide–binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1300, Fig. 3; **Figura 12–6b** PDB ID 1U7E, Kim, C., Xuong, N.-H., & Taylor, S.S. (2005) Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIα) subunits of PKA. *Science* 307, 690; **Recuadro 12–3 Figura 1** Chris Parks/ImageQuest Marine; **Recuadro 12–3 Figura 2** PDB ID 1GFL, Yang, F., Moss, L.G., & Phillips, G.N., Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14, 1246; **Figura 12–11a** PDB ID 1CLL, Chattopadhyaya, R., Meador, W.E., Means, A.R., & Quiocho, F. (1992) A calmodulin structure refined at 1.7 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* 228, 1177; **Figura 12–11b,c** PDB ID 1CDL, Meador, W.E., Means, A.R., & Quiocho, F.A. (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 angstroms structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* 257, 1251; **Figura 12–12a** Cortesía de Michael D. Cahalan, University of California, Irvine, Department of Physiology and Biophysics; **Figura 12–12b** Rooney, T.A., Sass, E.J., & Thomas, A.P. (1989) Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 17,131; **Figura 12–13** Adaptada de Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.-H., & Mak, D.-O.D. (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol. Rev.* 87, 593; **Figura 12–14b** (Receptor de insulina) derivada de PDB ID 2DTG, McKern, N.M., Lawrence, M.C., Streltsov, V.A., Lou, M.-Z., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Elleman, T.C., Richards, K.M., Bentley, J.D., Pilling, P.A., Hoyne, P.A., Cartledge, K.A., Pham, T.M., Lewis, J.L., Sankovich, S.E., Stoichevska, V., Da Silva, E., Robinson, C.P., Frenkel, M.J., Sparrow, L.G., Fernley, R.T., Epa, V.C., & Ward, C.W. (2006) Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 443, 218; (insulina) PDB ID 2CEU, Whittingham, J.L., Zhang, Y., Zakova, L., Dodson, E.J., Turkenburg, J.P., & Dodson, G.G. (2006) I222 crystal form of despentapeptide (B26-B30) insulin provides new insights into the properties of monomeric insulin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 505–511; **Figura 12–14c** PDB ID 1IRK, Hubbard, S.R., Wei, L., Ellis, L., & Hendrickson, W.A. (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372, 746; **Figura 12–14d** PDB ID 1IR3, Hubbard, S. R. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J.* 16, 5572; **Figura 12–21** PDB ID 1SHC, Zhou, M.M., Ravichandran, K.S., Olejniczak, E.F., Petros, A.M., Meadows, R.P., Sattler, M., Harlan, J.E., Wade, W.S., Burakoff, S.J., & Fesik, S.W. (1995) Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* 378, 584; **Figura 12–23** Adaptada de Pawson, T., Gish, G.D., & Nash, P. (2001) SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* 11, 504, Fig. 5; **Figura 12–26** Adaptada de Taylor, R. (1994) Evolutions: the voltage-gated sodium channel. *J. NIH Res.* 6, 112; **Figura 12–27a,b** Adaptada de Changeux, J.P. (1993) Chemical signaling in the brain. *Sci. Am.* 269 (noviembre), 58; **Figura 12–33** Adaptada de Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D., & Hirt, H. (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J.* 22, 1282; **Figura 12–34** Adaptada de Tichtinsky, G., Vanoosthuyse, V., Cock, J.M., & Gaude, T. (2003) Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends Plant Sci.* 8, 231, Fig. 1; **Figura 12–37** PDB ID 1BAC, Chou, K.-C., Carlacci, L., Maggiora, G.M., Parodi, L.A., & Schulz, M.W. (1992) An energy-based approach to packing the 7-helix bundle of bacteriorhodopsin. *Protein Sci.* 1, 810; **Figura 12–39** Adaptada de Nathans, J. (1989) The genes for color vision. *Sci. Am.* 260 (Febrero), 42; **Recuadro 12–4 Figura 1** Cortesía del profesor J. D. Mollon, Cambridge University, Department of Experimental Psychology; **Figura 12–44a** PDB ID 1HCK, Schulze-Gahmen, U., De Bondt, H.L., & Kim, S.-H. (1996) High-resolution crystal structures of human cyclin-dependent kinase 2 with and without ATP: bound waters and natural ligand as guides for inhibitor design. *J. Med. Chem.* 39, 4540; **Figura 12–44b** PDB ID 1FIN, Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., & Pavletich, N.P. (1995) Mechanism of Cdk activation revealed by the structure of a cyclin a-Cdk2 complex. *Nature* 376, 313; **Figura 12–44c** PDB ID 1JST, Russo, A.A., Jeffrey, P.D., & Pavletich, N.P. (1996) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* 3, 696. **Figura 12–45** Datos de Pines, J. (1999) Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* 1, E73; **Recuadro 12–5 Figura 1** CNRI/Photo Researchers; **Recuadro 12–5 Figura 2** PDB ID 1S9I, Ohren, J.F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., Yan, C., McConnell, P., Spessard, C., Banotai, C., Mueller, W.T., Delaney, A., Omer, C., Sebolt-Leopold, J., Dudley, D.T., Leung, I.K., Flamme, C., Warmus, J., Kaufman, M., Barrett, S., Tecle, H., & Hasemann, C.A. (2004) Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1192; **Recuadro 12–5 Figura 3a** PDB ID 1IEP, Nagar, B., Bornmann, W., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D.R., Miller, W.T., Clarkson, B., & Kuriyan, J. (2002) Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 62, 4236; **Recuadro 12–5 Figura 3b** PDB ID 1M17, Stamos, J., Sliwkowski, M.X., & Eigenbrot, C. (2002) Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* 277, 46,265; **Recuadro 12–5 Figura 3c** PDB ID 1S9I, véase cita del recuadro 12–5 Figura 2; **Recuadro 12–5 Figura 3d** PDB ID 2A4L, De Azevedo, W.F., Leclerc, S., Meijer, L., Havlicek, L., Strnad, M., & Kim, S.H. (1997) Inhibition of cyclin-

dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* 243, 518; **Figura 12–50** Adaptada de Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159.

CAPÍTULO 13 p. 489 Rudolf Clausius (1865) Über Verschiedene für die Anwendung bequeme Formen der Hauptgleichungen der mechanischen Wärmetheorie (Sobre varias formas convenientes de la segunda ecuación fundamental de la teoría mecánica del calor). En *The Mechanical Theory of Heat with Its Applications to the Steam-Engine and to the Physical Properties of Bodies* (Tyndall, J., trad.), John van Voorst, London, p. 365; François Jacob (1970) *The Logic of Life: A History of Heredity*, Pantheon Books, Inc., New York, 1973; originalmente publicado (1970) como *La logique du vivant: une histoire de l'hérédité*, Editions Gallimard, Paris; (Lavoisier) The Granger Collection; **p. 490** © Sidney Harris; **Figura 13–7** Adaptada de Layer, G., Heinz, D.W., Hahn, D., & Schubert, W.-D. (2004) Structure and function of radical SAM enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 472, Fig. 4; **Recuadro 13–1 Figura 1** E. R. Degginger/Photo Researchers; **Figura 13–25** PDB ID 1LDH, White, J.L., Hackert, M.L., Buehner, M., Adams, M.J., Ford, G.C., Lentz, P.J., Jr., Smiley, I.E., Steindel, S.J., & Rossmann, M.G. (1976) A comparison of the structures of apo dogfish M4 lactate dehydrogenase and its ternary complexes. *J. Mol. Biol.* 102, 759; **p. 519** (Strong, Elvehjem) Cortesía de University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry; (Woolley) Rockefeller Archive Center.

CAPÍTULO 14 p. 527 Arthur Harden (1923) *Alcoholic Fermentation*, 3d edn, Longmans, Green and Co., London; **p. 528** (von Euler-Chelpin) Austrian Archives/Corbis; (Embden) Cortesía de Institut für Biochemie I: Molekulare Bioenergetik, Universitaetsklinikum Frankfurt, ZBC; (Meyerhof) Hulton-Seutsch Collection/Corbis; **p. 531** (Harden) Hulton Getty/Liaison; (Young) Cortesía de Medical History Museum, The University of Melbourne; **p. 539** (Warburg) Hulton Archive by Getty Images; **Recuadro 14–1 Figura 3** ISM/Phototake; **Recuadro 14–2** Animals Animals; **Recuadro 14–3 Figura 1** Charles O'Rear/CORBIS.

CAPÍTULO 15 p. 569 C. F. Cori y G. T. Cori (1929) Glycogen formation in the liver from *d*- and *l*-lactic acid. *Journal of Biological Chemistry* 81, 389–403; Alfred A. Knopf, New York; **Figura 15–1** www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html; **p. 577** (Buchner) The Nobel Foundation; **Figura 15–7** Datos de Torres, N.V., Mateo, F., Melendez-Hevia, E., & Kacser, H. (1986) Kinetics of metabolic pathways: a system in vitro to study the control of flux. *Biochem. J.* 234, 169; **Recuadro 15–1 Figura 2** Fell, D. (1997) *Understanding the Control of Metabolism*, Portland, London, p. 103; **Figura 15–14a** PDB ID 1PFK, Shirakihara, Y. & Evans, P.R. (1988) Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* 204, 973; **Figura 15–18a** PDB ID 2NPP, Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J.W., Strack, S., Jeffrey, P.D., & Shi, Y. (2006) Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell* 127, 1239; **Figura 15–23** Adaptada de Chakravarty, K., Cassuto, H., Reshef, L., & Hanson, R.W. (2005) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40, 133, Fig. 2; **Figura 15–24** BCC Microimaging, reproducida con permiso; **p. 597** (Leloir) The Nobel Foundation; **Recuadro 15–4** (Coris) AP; **Figura 15–32** PDB ID 1LL2, Gibbons, B.J., Roach, P.J., & Hurley, T.D. (2002) Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J. Mol. Biol.* 319, 463; **p. 603** (Sutherland) The Nobel Foundation.

CAPÍTULO 16 p. 615 H. A. Krebs y W. A. Johnson (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4, 148; (Krebs) Cortesía de Public Relations Office, University of Sheffield; **Figura 16–5a,b** Cortesía de Dr. Z. Hong Zhou, University of Texas–Houston Medical School, Department of Pathology and Laboratory Medicine; **Figura 16–8a** PDB ID 5CSC, Liao, D.-I., Karpusas, M., & Remington, S.J. (1991) Crystal structure of an open conformation of citrate synthase from chicken heart at 2.8-Å resolution. *Biochemistry* 30, 6031; **Figura 16–8b** PDB ID 5CTS, Karpusas, M., Branchaud, B., & Remington, S.J. (1990) Proposed mechanism for the condensation reaction of citrate synthase: 1.9-angstroms structure of the ternary complex with oxaloacetate and carboxymethyl coenzyme A. *Biochemistry* 29, 2213; **Figura 16–9** Adaptada de Remington, J.S. (1992) Mechanisms of citrate synthase and related enzymes (triose phosphate isomerase and mandelate racemase). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 730; **Recuadro 16–1 Figura 1** Adaptada de Eisenstein, R.S. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 637, Fig.1; **Recuadro 16–1 Figura 2a** PDB ID 2B3Y, Dupuy, J., Volbeda, A., Carpentier, P., Darnault, C., Moulis, J.M., & Fontecilla-Camps, J.C. (2006) Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure* 14, 129; **Recuadro 16–1 Figura 2b** PDB ID 2IPY, Walden, W.E., Selezneva, A.I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J.C., Theil, E.C., & Volz, K. (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* 314, 1903; **Figura 16–12b** PDB ID 1SCU, Wolodko, W.T., Fraser, M.E., James, M.N.G., & Bridger, W.A. (1994) The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5 angstroms resolution. *J. Biol. Chem.* 289, 10,883; **Figura 16–21** Richard N. Trelease, Arizona State University, Department of Botany.

CAPÍTULO 17 p. 647 John Clarke (1639) *Paroemiologia Anglo-Latina (Proverbios ingleses y latinos)*, impreso por F. Kyngston para R. Mylbourne, London; **Recuadro 17–1** Stouffer Productions/Animals Animals; **Recuadro 17–2** (Hodgkin) The Nobel Foundation.

CAPÍTULO 18 p. 673 Hans Krebs (1970) The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspectives in Biology and Medicine* 14, 154–170, 161–162; **Figura 18–5c,d,e** PDB ID 1AJS, Rhee, S., Silva, M.M., Hyde, C.C., Rogers, P.H., Metzler, C.M., Metzler, D.E., & Arnone, A. (1997) Refinement and comparisons of the crystal structures of pig cytosolic aspartate aminotransferase and its complex with 2-methylaspartate. *J. Biol. Chem.* 272, 17,293.

CAPÍTULO 19 p. 707 Claude Bernard (1865) *An Introduction to the Study of Experimental Medicine* (H. C. Greene, trad.), Harry Schumann, Paris. Reimpreso (1957) por Dover Publications, New York; Peter Mitchell (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206, 1148–1159; **p. 708** (Lehninger) Alan Mason Chesney Medical Archives of The Johns Hopkins Medical Institutions; **Figura 19–5d** PDB ID 1FRD, Jacobson, B.L., Chae, Y.K., Markley, J.L., Rayment, I., & Holden, H.M. (1993) Molecular structure of the oxidized, recombinant, heterocyst (2Fe-2S) ferredoxin from Anabaena 7120 determined to 1.7 ångstroms resolution. *Biochemistry* 32, 6788; **Figura 19–9** PDB ID 2FUG, Sazanov, L.A. & Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* 311, 1430; **Figura 19–10** PDB ID 1ZOY, Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. *Cell* 121, 1043; **Figura 19–11a** PDB ID 1BGY, Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., & Jap, B.K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *Science* 281, 64; **Figura 19–13** PDB ID 1OCC, Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., & Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136; **Figura 19–14** Adaptada de Williams, R.J.P. (1995) *Nature* 378, 235, a correction to Williams, R.J.P. (1995) Purpose of proton pathways. *Nature* 376, 643; **Figura 19–15a,b** Cortesía de Egbert Boekema. Reimpresa con permiso de Heinemeyer, J., Braun, H.-P., Boekema, E.J., & Kour, R. (2007) A structural model of the cytochrome c reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 282, 12,240–12,248, Figs 4A and 5A; **p. 723** (Mitchell) AP/Wide World Photos; **Recuadro 19–1 Figura 1** D. Cavagnaro/Visuals Unlimited; **p. 725** (Racker) Cortesía de E. Racker; **Figura 19–16** PDB ID 2FUG, 1ZOY, 1BGY y 1OCC; véase citas para las Figuras 19–9, 19–10, 19–11a y 19–13; PDB ID 1HRC, Bushnell, G.W., Louie, G.V., & Brayer, G.D. (1990) High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome *c*. *J. Mol. Biol.* 214, 585; **Figura 19–23b** PDB ID 1BMF, Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., & Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F_1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621; **Figura 19–25b,c** PDB ID 1BMF, véase cita para la Figura 19–23b; **p. 727** (Walker) The Nobel Foundation; **Figura 19–25d,e** PDB ID 1QO1, Stock, D., Leslie, A.G.W., & Walker, J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286, 1700; protein backbones were calculated from the C_α PDB entry using MIDAS-PLUS and Sybyl; **Figura 19–25f** Adaptada de Fillingame, R.H. (1999) Protein structure: molecular rotary motors. *Science* 286, 1687; **p. 729** (Boyer) The Nobel Foundation; **Figura 19–27 (izquierda)** Adaptada de Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., & Futai, M. (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F_oF_1): direct observation. *Science* 286, 1722–1724; **Figura 19–27 (derecha)** Cortesía de Ryohei Yasuda and Kazuhiko Kinosita, de Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr., & Yoshida, M. (1998) F_1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell* 93, 1117; **Figura 19–31** PDB ID 1OHH, Cabezon, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., & Walker, J.E. (2003) The structure of bovine F_1-ATPase in complex with its regulatory protein IF_1. *Nat. Struct. Biol.* 10, 744; **Figura 19–32** Adaptada de Harris, D.A. (1995) *Bioenergetics at a Glance*, Blackwell Science, London, p. 36; **Figura 19–35** Don W. Fawcett/Photo Researchers; **Figura 19–37** Adaptada de Riedl, S.J. & Salvesen, G.S. (2007) The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 409, Fig. 3; **Figura 19–38a** Morris, M.A. (1990) Mitomutations in neuro-ophthalmological diseases: a review. *J. Clin. Neuroophthalmol.* 10, 159; **Figura 19–38b** De Wallace, D., Zheng, X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., Epstein, C.M., & Hopkins, L.C. (1988) Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 55, 601; **Figura 19–40** Michael W.

Davidson, Florida State University; **Figura 19–41b** Cortesía de Rob Taylor. Reimpresa con permiso de Taylor, R.W. & Turnbull, D.M. (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6, 389–402, Fig. 2a; **Figura 19–45b** Biological Photo Service; **Figura 19–49** PDB ID 2BHW, Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Lamborghini, M., & Kuhlbrandt, W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 24, 919; **Figuras 19–50, 19–54a,b, 19–60b, 19–61, 19–65** Adaptada de Heldt, H.-W. (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, Oxford, pp. 57, 62, 63, 100, 101, 133; **Figura 19–55** PDB ID 1PRC, Deisenhofer, J., Epp, O., Sinning, I., & Michel, H. (1995) Crystallographic refinement at 2.3 angstroms resolution and refined model of the photosynthetic reaction center from *Rhodopseudomonas viridis*. *J. Mol. Biol.* 246, 429; **Figura 19–57** Adaptada de Rutherford, A.W. & Faller, P. (2001) The heart of photosynthesis in glorious 3D. *Trends Biochem. Sci.* 26, 341, Fig. 1; **Figura 19–58a** Adaptada de Kuhlbrandt, W. (2001) Structural biology: chlorophylls galore. *Nature* 411, 896, Fig. 1; **Figura 19–58b,c** PDB ID 1JBO, Nield, J., Rizkallah, P.J., Barber, J., & Chayen, N.E. (2003) The 1.45Å three-dimensional structure of c-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *J. Struct. Biol.* 141, 149; **Figura 19–59a,b** PDB ID 1UM3, Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J.L., & Cramer, W.A. (2003) Structure of the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* 302 1009; **p. 759** (Arnon) University of California, Berkeley; (Jagendorf) Cornell University; **Figura 19–60a** PDB ID 2AXT, Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., & Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* 438, 1040; PDB ID 2E74, Yamashita, E., Zhang, H., & Cramer, W.A. (2007) Structure of the cytochrome b_6f complex: quinone analogue inhibitors as ligands of heme c_n. *J. Mol. Biol.* 370, 39; PDB ID 1A70, Binda, C., Coda, A., Aliverti, A., Zanetti, G., & Mattevi, A. (1998) Structure of the mutant E92K of [2Fe-2S] ferredoxin I from *Spinacia oleracea* at 1.7 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54, 1353; PDB ID 1AG6, Xue, Y., Okvist, M., Hansson, O., & Young, S. (1998) Crystal structure of spinach plastocyanin at 1.7 Å resolution. *Protein Sci.* 7, 2099; PDB ID 2O01, Amunts, A., Drory, O., & Nelson, N. (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* 447, 58; PDB ID 1QG0, Deng, Z., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A.K., Ottado, J., Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., Ceccarelli, E.A., Carrillo, N., & Karplus, P.A. (1999) A productive $NADP^+$ binding mode of ferredoxin-$NADP^+$ reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies. *Nat. Struct. Biol.* 6, 847; PDB ID 1QO1, véase cita para la Figura 19–25d,e; **Figura 19–66a** PDB ID 1C8R, Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., & Lanyi, J.K. (1999) Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Å resolution. *Science* 286, 255; **Figura 19–66b** Adaptada de Gennis, R.B. & Ebrey, T.G. (1999) Proton pump caught in the act. *Science* 286, 252.

CAPÍTULO 20 p. 773 Melvin Calvin (1961) Conferencia Nobel, www.nobel.se/chemistry/laureates/1961/calvin-lecture.html; **Figura 20–1** PhotoDisc; **p. 774** (Calvin) The Nobel Foundation; **Figura 20–2** Ken Wagner/Visuals Unlimited; **Figura 20–5a** PDB ID 8RUC, Andersson, I. (1996) Large structures at high resolution: the 1.6 angstroms crystal structure of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol bisphosphate. *J. Mol. Biol.* 259, 160; **Figura 20–5b** PDB ID 9RUB, Lundqvist, T. & Schneider, G. (1991) Crystal structure of activated ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase complexed with its substrate, ribulose-1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 266, 12,604; **Figura 20–6** PDB ID 1RCX, Taylor, T.C. & Andersson, I. (1997) The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J. Mol. Biol.* 265, 432; **Figura 20–18** Halliwell, B. (1984) *Chloroplast Metabolism: The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*, Clarendon Press, Oxford, p. 97; **Figura 20–23a** Ray Evert, University of Wisconsin–Madison, Department of Botany; **Figura 20–29** (celulosa) Ken Wagner/Visuals Unlimited; adaptado de Becker, W. M. & Deamer, D.W. (1991) *The World of the Cell*, 2nd edn, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City, CA, p. 60, Fig. 3–20; **Figura 20–30 inserto** Cortesía de Mark J. Grimson, Texas Tech University, y Candace H. Haigler, North Carolina State University; **p. 804 (problema 19)** Cortesía de Elena V. Voznesenskaya, Vincent R. Franceschi, Olavi Kiirats, Elena G. Artyusheva, Helmut Freitag y Gerald E. Edwards.

CAPÍTULO 21 p. 805 Konrad Bloch (1987) Summing up. *Annual Review of Biochemistry* 56, 10; **Figura 21–3a** PDB ID 2CF2, Maier, T., Jenni, S., Ban, N. (2006) Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* 311, 1258; **Figura 21–3b** PDB IDs 2UV9, 2UVA, 2UVB y 2UVC, Jenni, S., Leibundgut, M., Boehringer, D., Frick, C., Mikolasek, B., Ban, N. (2007) Structure of fungal fatty acid synthase and implications for iterative substrate shuttling. *Science* 316, 254; **Figura 21–11b** Daniel Lane, The Johns Hopkins University, School of Medicine; **p. 825** (Kennedy) Harvard Medical School; **p. 835** (Bloch, Lynen, Cornforth) AP/Wide World Photos; (Popják) Corbis/UPI/Bettmann; **Figura 21–39b** Cortesía de Robert L. Hamilton y el Arteriosclerosis Specialized Center of Research, University of California, San Francisco; **Figura 21–40b** Alan Attie, University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry; **p. 841** (Brown y Goldstein) Corbis/UPI/Bettmann; **Recuadro 21–3** (Endo) Cortesía de Akira Endo, Ph.D.; (Alberts) Cortesía de Alfred W. Alberts; (Vagelos) Cortesía de P. Roy Vagelos.

CAPITULO 22 p. 851 Gertrude Elion, citada en S. B. McGrayne (2002) Damn the torpedoes. Full speed ahead. *Science* 296, 851–852; **Recuadro 22–1 Figuras 1, 2** Adaptadas de van Niftrik, L.A., Fuerst, J.A., Damsté, J.S.S., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., & Strous, M. (2004) The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 10, Figs 4 y 3; **Recuadro 22–1 Figura 3** Cortesía de John Fuerst. Reimpresa con permiso de Lindsay, M.R., Webb, R.I., Strous., M., Jetten, M.S., Butler, M.K., Forde, R.J., & Fuerst, J.A. (2001) Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Arch. Microbiol.* 175, 421, Fig. 6A; **Figura 22–3** PDB ID 1N2C, Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J.L., Howard, J.B., & Rees, D.C. (1997) Structure of ADP X Alf4 -stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature* 387, 370; **Figura 22–4a** C. P. Vance/Visuals Unlimited; **(inserto)** Ric Ergenbright/Corbis; **Figura 22–4b** Jeremy Burgess/Photo Researchers; **Figura 22–5** PDB ID 2GLS, Yamashita, M.M., Almassy, R.J., Janson, C.A., Cascio, D., & Eisenberg, D. (1989) Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 angstroms resolution. *J. Biol. Chem.* 264, 17,681; **Recuadro 22–3 Figura 1** John Mansfield, University of Wisconsin–Madison, Department of Veterinary Science; **p. 883** (Buchanan) Massachusetts Institute of Technology Museum Collection; **Figura 22–37** PDB ID 1M6V, Thoden, J.B., Huang, X., Raushel, F.M., & Holden, H.M. (2002) Carbamoyl-phosphate synthetase: creation of an escape route for ammonia. *J. Biol. Chem.* 277, 39,722; Jim Thoden y Hazel Holden, University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry y Enzyme Institute, proporcionaron datos preliminares para la ruta del canal; **Figura 22–40a** Thelander, L. & Reichard, P. (1979) Reduction of ribonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 133; **Figura 22–40b** PDB ID 1PFR, Logan, D.T., Su, X.D., Aberg, A., Regnstrom, K., Hajdu, J., Eklund, H., & Nordlund, P. (1996) Crystal structure of reduced protein r2 of ribonucleotide reductase: the structural basis for oxygen activation at a dinuclear iron site. *Structure* 4, 1053; **p. 894** (Elion y Hitchings) Cortesía de Kathy Bendo Hitchings.

CAPÍTULO 23 p. 901 Charles Édouard Brown-Séquard y J. d'Arsonval (1891) Additions à une note sur l'injection des extraits liquides de divers organes, comme méthode thérapeutique (Complementos a una nota sobre la inyección de extractos acuosos en diversos órganos como método terapéutico). *Comptes Rendus de la Société de Biologie* (9)3, 267; **Recuadro 23–1** (Banting, MacLeod, Best, Collip) Corbis/UPI/Bettmann; **p. 904** (Guillemin) Corbis/UPI/Bettmann; (Schally) AP/Wide World Photos; (Yalow) Cortesía de Rosalyn S. Yalow, Veterans Affairs Medical Center, New York; **Figura 23–3** Adaptada de Orth, D.N. (1975) General considerations for radioimmunoassay of peptide hormones. *Methods Enzymol.* 37, 22; **Figura 23–16a** Fred Hossler/Visuals Unlimited; **Figura 23–19** Reimpresa con permiso de Blei, M.L., Conley, K.E., & Kushmerick, M.J. (1993) Separate measures of ATP utilization and recovery in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 465, 210, Fig. 4; **Figura 23–21** D. W. Fawcett/Photo Researchers; **Figura 23–23** Cortesía de M. L. Thomas, H. C. Sing, G. Belenky, Walter Reed Army Institute of Research, U.S. Army Medical Research Materiel Command, Division of Neuropsychiatry; **Figura 23–29b** Coordenadas cortesía de Frances M. Ashcroft, Oxford University, utilizada con permiso de S. Haider y M. S. P. Sansom para recrear un modelo publicado en Antcliff, J.F., Haider, S., Proks. P., Sansom, M.S.P., Ashcroft, F.M. (2005) Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the K_{ATP} channel Kir6.2 subunit. *EMBO J.* 24, 229–239; **Figura 23–34** John Sholtis, The Rockefeller University, New York; **Figura 23–35** Adaptada de Ezzell, C. (1995) Fat times for obesity research: tons of new information, but how does it all fit together? *J. NIH Res.* 7, 39; **Figura 23–36** Adaptada de Schwartz, M.W. & Morton, G.J. (2002) Obesity: keeping hunger at bay. *Nature* 418, 595, Fig. 1; **Figura 23–37** Adaptada de Auwerx, J. & Staels, B. (1998) Leptin. *Lancet* 351, 737; **Figura 23–40** Adaptada de http://web.indstate.edu/theme/mwking/ampk.html and Steinberg, G.R. & Kemp, B.E. (2007) Adiponectin: starving for attention. *Cell Metab.* 6, 4, Fig. 1; **Figura 23–42** Adaptada de Evans, R.M., Barish, G.D., & Wang, Y.-X. (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 10, 355–361, Fig. 3; **Figura 23–43** Adaptada de Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., & Weigle, D.S. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714, Fig. 1; **Figura 23–44** Adaptada de Nadler, S.T. & Attie, A.D. (2001) Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J. Nutr.* 131, 2080.

CAPÍTULO 24 **p. 947** N. R. Cozzarelli (1993) The structure and function of DNA supercoiling and catenanes. *Harvey Lectures* 87, 35–55; **Figura 24–1** From Kleinschmidt, A.K., Land, D., Jackerts, D., & Zahn, R.K. (1962) Darstellung und Längenmessungen des gesamten Desoxyribonucleinsäure-Inhalter von T_2-Bakteriophagen. *Biochim. Biophys. Acta* 61, 857–864; **p. 948** (Beadle) Archive Photos; (Tatum) Corbis/UPI/Bettmann; **Figura 24–4** Huntington Potter y David Dressler, Harvard Medical School, Department of Neurobiology; **Figura 24–5a,b** G. F. Bahr/Biological Photo Service; **Figura 24–6** D. W. Fawcett/Photo Researchers; **Figura 24–11** Adaptada de Cozzarelli, N.R., Boles, T.C., & White, J.H. (1990) Primer on the topology and geometry of DNA supercoiling. En *DNA Topology and Its Biological Effects* (Cozzarelli, N.R. & Wang, J.C., eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139–184; **Figura 24–12** Adaptada de Saenger, W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, p. 452; **Figura 24–13** Laurien Polder, de Kornberg, A. (1980) *DNA Replication*, W. H. Freeman & Company, New York, p. 29; **Figuras 24–14, 24–15** Véase cita para la Figura 24–11; **Figura 24–20** Keller, W. (1975) Characterization of purified DNA-relaxing enzyme from human tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2553; **Figuras 24–21, 24–22** Adaptada de Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369, Figs 3, 11; **Figura 24–23a** James H. White, T. Christian Boles y N. R. Cozzarelli, University of California, Berkeley, Department of Molecular and Cell Biology; **Figura 24–26b** Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory; **Figura 24–27** PDB ID 1AOI, Luger, K., Maeder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., & Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251; **Recuadro 24–2 Figura 1** Adaptada de Sarma, K. & Reinberg, D. (2005) Histone variants meet their match. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 140; **Recuadro 24–2 Figura 2b** Datos cortesía de Steve Henikoff. Reimpresa con permiso de Mito, Y., Henikoff, J.G., & Henikoff, S. (2005) Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat. Genet.* 37, 1092; **Figura 24–30b** Barbara Hamkalo, University of California, Irvine, Department of Molecular Biology and Biochemistry; **Figura 24–31** D. W. Fawcett/Visuals Unlimited; **Figura 24–34a,b** Adaptada de Hirano, T. (2002) The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* 16, 399; **Figura 24–34c** Thomas E. Melby, Charles N. Ciampaglio, Gina Briscoe, y Harold P. Erickson; **Figura 24–34d,e** Adaptada de Nasmyth, K. & Haering, C.H. (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 611, 614, Figs 4, 5; **Figura 24–35** Adaptada de Bazett-Jones, D.P., Kimura, K., & Hirano, T. (2002) Efficient supercoiling of DNA by a single condensin complex as revealed by electron spectroscopic imaging. *Mol. Cell* 9, 1183, Fig. 5; **p. 973 (problema 9)** Roger Kornberg, MRC Laboratory of Molecular Biology; **(problema 14)** Bowater, R.P. (2005) Supercoiled DNA: structure. En *Encyclopedia of Life Sciences*, doi: 10.1038/npg.els.0006002, John Wiley & Sons, Inc./Wiley InterScience, www.els.net.

CAPÍTULO 25 **p. 975** Arthur Kornberg (1975) For the love of enzymes. En *In Honour of Severo Ochoa* (A. Kornberg et al., eds), Pergamon Press, New York, 1976, pp. 243–251; **Figura 25–3b** Cortesía del dr. R. G. Wake, University of Sydney, Australia. Reimpresa con permiso de Gyurasits, E.B. & Wake, R.G. (1973) Bidirectional chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 73, Plate I(f); **p. 979** (Kornberg) AP/Wide World Photos; **Figura 25–8** PDB ID 3BDP, Kiefer, J.R., Mao, C., Braman, J.C., & Beese, L.S. (1998) Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature* 391, 304; **Figura 25–10b** PDB ID 2POL, Kong, X.-P., Onrust, R., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (1992) Three-dimensional structure of the β subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* 69, 425; **Figura 25–12** Adaptada de las figuras en Erzberger, J.P., Mott, M.L., & Berger, J.M. (2006) Structural basis for ATP-dependent DnaA assembly and replication-origin remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 676–683; **Figura 25–14** Adaptada de una animación amablemente proporcionada por Mike O'Donnell, The Rockefeller University; **Figura 25–18** Wake, R.G. & King, G.F. (1997) A tale of two terminators: crystal structures sharpen the debate on DNA replication fork arrest mechanisms. *Structure* 5, 1; **Figura 25–18b** Adaptada de Lemon, K.P. & Grossman, A.D. (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes Dev.* 15, 2031; **Figura 25–19** Bruce N. Ames, University of California, Berkeley, Department of Biochemistry and Molecular Biology; **Figura 25–20** Adaptada de una figura proporcionada por Sivaprasad, U., Dutta, A., & Bell, S.P. (2006) Assembly of pre-replication complexes. En *DNA Replication and Human Disease* (DePamphilis, M.L., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 141–152; **Figura 25–21** Adaptada de una figura proporcionada por Paul Modrich; **Figura 25–22** Adaptada de Grilley, M., Griffith, J., & Modrich, P. (1993) Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 268, 11,830; **Figura 25–23** Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A., & Weiner, A.M. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 4th edn, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA, p. 350; **Figura 25–24** Adaptada de una figura proporcionada por Aziz Sancar; **p. 1004** (McClintock) AP/Wide World Photos; **Figura 25–32b** Bernard John, The Australian National University; **Figura 25–33b** Huntington Potter y David Dressler, Harvard Medical School, Department of Neurobiology; **Figura 25–36a** John Heuser, Washington University Medical School, Department of Biochemistry; **Figura 25–36b** PDB ID 2REB, Story, R.M., Weber, I.T., & Steitz, T.A. (1992) The structure of the *E. coli* RecA protein monomer and polymer. *Nature* 355, 318; **Figura 25–38** Roca, A.I. & Cox, M.M. (1990) The RecA protein: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 415; **Figura 25–40a** Adaptada de Guo, F., Gopaul, D.N., & Van Duyne, G.D. (1997) Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389, 40; **Figura 25–40b** PDB ID 3CRX, Gopaul, D.N., Guo, F., & Van Duyne, G.D. (1998) Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-Loxp site-specific recombination. *EMBO J.* 17, 4175.

CAPÍTULO 26 **p. 1021** Francis H. C. Crick (1958) The biological replication of macromolecules. *Symposium of the Society of Experimental Biology* 12, 146; **Figura 26–4** PDB ID 1IW7, Vassylyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M.N., Borukhov, S., & Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417, 712; **Figura 26–6b** Derivada de coordenadas suministradas por Seth Darst, The Rockefeller University; **Figura 26–8** Landick, R. (1997) RNA polymerase slides home: pause and termination site recognition. *Cell* 88, 741; **Recuadro 26–1 Figura 2** Carol Gross, University of California, San Francisco, Department of Stomatology; **Figura 26–10b** PDB ID 1TGH, Juo, Z.S., Chiu, T.K., Leiberman, P.M., Baikalov, I., Berk, A.J., & Dickerson, R.E. (1996) How proteins recognize the TATA-box. *J. Mol. Biol.* 261, 239; **Figura 26–10c** Adaptada de Klug, A. (2001) A marvelous machine for making messages. *Science* 292, 1844–1846; **Figura 26–11b** PDB ID 1DSC, Lian, C., Robinson, H., & Wang, A.H.-J. (1996) Structure of actinomycin D bound with $(GAAGCTTC)_2$ and $(GATGCTTC)_2$ and its binding to the (CAG)N:(CTG)N triplet sequence by NMR analysis. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 8791; **Figura 26–13a** Pierre Chambon, Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes, Faculté de Médecine (CNRS); **Figura 26–13b,c** Chambon, P. (1981) Split genes. *Sci. Am.* 244 (Mayo), 60; **p. 1037** (Cech) Corbis/UPI/Bettmann; **Figura 26–16** Cech, T.R. (1986) RNA as an enzyme. *Sci. Am.* 255 (Noviembre), 64; **Figura 26–17a** Kramer, A. (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 367; **Figura 26–22** Adaptada de Blencowe, B.J. (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126, 38, Fig. 2; **Figura 26–26** Adaptada de Kiss, T. (2002) Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109, 146; **Figura 26–28** Adaptada de Wienholds, E. & Plasterk, R.H.A. (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 579, 5914; **Figura 26–29b** PDB ID 1MME, véase cita para la Figura 8–25b; **Figura 26–30** Cech, T.R., Damberger, S.H., & Gutell, R.R. (1994) Representation of the secondary and tertiary structure of group I introns. *Struct. Biol.* 1, 273; **Figura 26–31** Cech, T.R. (1986) RNA as an enzyme. *Sci. Am.* 255 (Noviembre), 64; **p. 1049** (Grunberg-Manago) Cortesía de Marianne Grunberg-Manago; (Ochoa) AP/Wide World Photos; **p. 1051** (Temin) Corbis/UPI/Bettmann; (Baltimore) AP/Wide World Photos; **Figura 26–36** Haseltine, W.A. & Wong-Staal, F. (1988) The molecular biology of the AIDS virus. *Sci. Am.* 259 (Octubre), 52; **Figura 26–37** Kingsman, A.J. & Kingsman, S.M. (1988) Ty: a retroelement moving forward. *Cell* 53, 333; **Figura 26–39a** Boeke, J.D. (1990) Reverse transcriptase, the end of the chromosome, and the end of life. *Cell* 61, 193; **Figura 26–39c** Jack Griffith, University of North Carolina en Chapel Hill, Comprehensive Cancer Center; **p. 1056** (Woese, Crick, Orgel) AP/Wide World Photos; **Recuadro 26–3 Figura 3** PDB ID 1RAW, Dieckmann, T., Suzuki, E., Nakamura, G.K., & Feigon, J. (1996) Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold. *RNA* 2, 628.

CAPÍTULO 27 **p. 1065** Gerald Joyce, citado en M. M. Waldrop (1992) Finding RNA makes proteins gives "RNA World" a big boost. *Science* 256, 1396–1397; **p. 1065** (Zamecnik) News Office, Massachusetts General Hospital; **Figura 27–1** D. W. Fawcett/Visuals Unlimited; **p. 1067** (Nirenberg) AP/Wide World Photos; **p. 1068** (Khorana) Cortesía de Archives, University of Wisconsin–Madison; **p. 1076** Cortesía de Masayasu Nomura; **Figura 27–13a,b,c** PDB ID 2OW8, 1VSA, 1GIX, Korostelev, A., Trakhanov, S., Laurberg, M., & Noller, H.F. (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell* 126, 1065; **Figura 27–13d** PDB ID 1Q7Y, Hansen, J.L., Schmeing, T.M., Moore, P.B., & Steitz, T.A. (2002) Structural insights into peptide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11,670; **Recuadro 27–2 Figura 1** PDB ID 1NKW, Harms, J.M., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., & Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 107, 679; **p. 1080**

(Holley) Corbis/UPI/Bettmann; **Figura 27–18b** PDB ID 4TRA, Westhof, E., Dumas, P., & Moras, D. (1988) Restrained refinement of two crystalline forms of yeast aspartic acid and phenylalanine transfer RNA crystals. *Acta Crystallogr. A* 44, 112; **Figura 27–22a** PDB ID 1QRT, Arnez, J.G. & Steitz, T.A. (1996) Crystal structures of three misacylating mutants of *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP. *Biochemistry* 35, 14,725; **Figura 27–22b** PDB ID 1ASZ, Cavarelli, J., Eriani, G., Rees, B., Ruff, M., Boeglin, M., Mitschler, A., Martin, F., Gangloff, J., Thierry, J.C., & Moras, D. (1994) The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: structural and functional aspects of the aminoacylation reaction. *EMBO J.* 13, 327; **Recuadro 27–3 Figura 2** Adaptada de Xie, J.M. & Schultz, P.G. (2006) Innovation: a chemical toolkit for proteins—an expanded genetic code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 778; **Figura 27–30b (izquierda)** PDB ID 1B23, Nissen, P., Thirup, S., Kjeldgaard, M., & Nyborg, J. (1999) The crystal structure of Cys-tRNACys-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA. *Struct. Fold. Des.* 7, 143; **Figura 27–30b (derecha)** PDB ID 1DAR, al-Karadaghi, S., Aevarsson, A., Garber, M., Zheltonosova, J., & Liljas, A. (1996) The structure of elongation factor G in complex with GDP: conformational flexibility and nucleotide exchange. *Structure* 4, 555; **Figura 27–32b** Steven L. McKnight y Oscar L. Miller, University of Virginia, Department of Biology; **p. 1100** (Blobel) Cortesía de Günter Blobel, The Rockefeller University; **p. 1101** (Palade) AP/Wide World Photos; **Figura 27–42b** D. W. Fawcett/Photo Researchers; **Figura 27–45** Adaptada de Mayor, S. & Pagano, R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 604; **Figura 27–46c** John Heuser, Washington University Medical School, Department of Biochemistry; **Figura 27–48a** PDB ID 1IRU, Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., & Tsukihara, T. (2002) The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 10, 609.

CAPÍTULO 28 p. 1115 François Jacob y Jacques Monod (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3, 318–356; **p. 1119** (Jacob, Monod) Corbis/Bettmann; **Figura 28–7b** Cortesía de M. Thomas Record y Oleg Tsodikov, University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry; **Figura 28–7c,d** PDB ID 1LBG, 1LBH, Lewis, M., Chang, G., Horton, N.C., Kercher, M.A., Pace, H.C., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., & Lu, P. (1996) Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271, 1247. Se añadieron cadenas laterales a los C_α, únicos datos de PDB con programas informáticos MIDAS-PLUS y Sybyl. **Figura 28–11a,c,d** PDB ID 1LCC, Chuprina, V.P., Rullmann, J.A.C., Lamerichs, R.M.J.N., Van Boom, J.H., Boelens, R., & Kaptein, R. (1993) Structure of the complex of Lac repressor headpiece and an 11 base-pair half-operator determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy and restrained molecular dynamics. *J. Mol. Biol.* 234, 446; **Figura 28–11b** PDB ID 1LBG, véase cita para la Figuras 28–7c,d; **Figura 28–12** PDB ID 1A1L, Elrod-Erickson, M., Benson, T.E., & Pabo, C.O. (1998) High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger–DNA recognition. *Structure* 6, 451; **Figura 28–13** PDB ID 1B8I, Passner, J.M., Ryoo, H.-D., Shen, L., Mann, R.S., & Aggarwal, A.K. (1999) Structure of a DNA-bound ultrabithorax-extradenticle homeodomain complex. *Nature* 397, 714; **Figura 28–14a** McKnight, S.L. (1991) Molecular zippers in gene regulation. *Sci. Am.* 264 (Abril), 54–64; **Figura 28–14b** PDB ID 1YSA, Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K., & Harrison, S.C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71, 1223; **Figura 28–15** PDB ID 1HLO, Brownlie, P., Ceska, T.A., Lamers, M., Romier, C., Theo, H., & Suck, D. (1997) The crystal structure of an intact human max-DNA complex: new insights into mechanisms of transcriptional control. *Structure* 5, 509; **Figura 28–16** PDB ID 1RUN, Parkinson, G., Gunasekera, A., Vojtechovsky, J., Zhang, X., Kunkel, T.A., Berman, H., & Ebright, R.H. (1996) Aromatic hydrogen bond in sequence-specific protein-DNA recognition. *Nat. Struct. Biol.* 3, 837; **Figura 28–20** PDB ID 1TRO, Otwinowski, Z., Schevitz, R.W., Zhang, R.-G., Lawson, C.L., Joachimiak, A.J., Marmorstein, R., Luisi, B.F., & Sigler, P.B. (1988) Crystal structure of Trp repressor operator complex at atomic resolution. *Nature* 335, 321; **Figura 28–21a** Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A., & Weiner, A.M. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 4th edn, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA, p. 487; **Figura 28–23** Nomura, M., Gourse, R., & Baughman, G. (1984) Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 75; **Figura 28–25** Adaptada de Szymański, M. & Barciszewski, J. (2002) Beyond the proteome: non-coding regulatory RNAs. *Genome Biol.* 3, 6; **Figura 28–26** Adaptada de Winkler, W.C. & Breaker, R.R. (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 493; **Figura 28–27** John D. Cunningham/Visuals Unlimited; **Figura 28–31** Schwabe, J.W.R. & Rhodes, D. (1991) Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends Biochem. Sci.* 16, 291; **Figura 28–37** F. R. Turner, University of Indiana, Bloomington, Department of Biology; **p. 1149** (Nüsslein-Volhard) AP/Wide World Photos/Mark Lennihan; **Figura 28–39** Wolfgang Driever y Christiane Nüsslein-Volhard, Max-Planck-Institut; **Figura 28–40** Adaptada de una figura proporcionada por Marv Wickens, University of Wisconsin–Madison, Department of Biochemistry; **Figura 28–41b** Cortesía de Phillip Ingham, Imperial Cancer Research Fund, Oxford University; **Figura 28–43a,b** F. R. Turner, University of Indiana, Bloomington, Department of Biology; **Figura 28–43c,d** E. B. Lewis, California Institute of Technology, Division of Biology; **Recuadro 28–1 Figura 1** Adaptada de Abzhanov, A., Kuo, W.P., Hartmann, C., Grant, B.R., Grant, P.R., & Tabin, C.J. (2006) The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches. *Nature* 442, 565, Fig. 4.

Apéndice A

Abreviaturas comunes en la literatura científica bioquímica

Å	angstrom
A	adenina, adenosina o adenilato
A	absorbancia
Ab	anticuerpo
ABC	casete de fijación de ATP
ACAT	acil-CoA colesterol acil transferasa
ACC	acetil-CoA carboxilasa
ACh	acetilcolina
ACP	proteína transportadora de grupos acilo
ACTH	hormona adrenocorticotrópica
acil-CoA	acil-derivados del coenzima A (también acil-S-CoA)
ADH	alcohol deshidrogenasa
AdoHcy	*S*-adenosilhomocisteína
AdoMet	*S*-adenosilmetionina (también SAM)
Ag	antígeno
AGE	producto final de glicación avanzada
AKAP	proteína de anclaje de la quinasa A
Ala	alanina
$[\alpha]_D^{25\,°C}$	rotación específica
AMP, ADP, ATP	adenosina 5′-mono-, di-, trifosfato
AMPK	proteína quinasa activada por AMP
ANF	factor natriurético de la aurícula
AQP	acuaporina
Arg	arginina
ARS	secuencia de replicación autónoma
Asn	asparagina
Asp	aspartato
ATCasa	aspartato transcarbamilasa
atm	atmósfera
ATPasa	adenosina trifosfatasa
B_{12}	coenzima B_{12}, cobalamina
BAC	cromosoma artificial bacteriano
BAT	tejido adiposo marrón
BMR	tasa metabólica basal
1,3,-BPG	1,3-bisfosfoglicerato
C	citosina, citidina o citidilato
CAM	metabolismo ácido de las crasuláceas
CaM	calmodulina
cAMP	3′,5′-AMP cíclico
CD	dicroísmo circular
CDK	proteína quinasa dependiente de ciclina
cDNA	DNA complementario
CFTR	regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
cGMP	3′,5′-GMP cíclico
Chl	clorofila
ChREBP	proteína de unión del elemento de respuesta de glúcidos
cit	citocromo
CKII	caseína quinasa II
CL	cardiolipina
CMP, CDP, CTP	citidina 5′-mono-, di-, trifosfato
CoA	coenzima A (también CoASH)
COHb	monóxido de carbono-hemoglobina
CoQ	coenzima Q (ubiquinona; también UQ)
COX	ciclooxigenasa; citocromo oxidasa
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico
CRP	proteína receptora de cAMP
Cys	cisteína
D	dihidrouridina
D	coeficiente de difusión
d	densidad
dADP, dGDP, etc.	desoxiadenosina 5′-difosfato, desoxiguanosina 5′-difosfato, etc.
dAMP, dGMP, etc.	desoxiadenosina 5′-monofosfato, desoxiguanosina 5′-monofosfato, etc.
dATP, dGTP, etc.	desoxiadenosina 5′-trifosfato, desoxiguanosina 5′-trifosfato, etc.
DEAE	dietilaminoetil
DFP	diisopropilfluorofosfato (también DIFP)
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DHF	dihidrofolato (también H_2 folato)
DMS	dimetil sulfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
DNP	2,4-dinitrofenol
Dol	dolicol
dopa	dihidroxifenilalanina
E	potencial eléctrico
E.C.	Comisión de Enzimas (seguido de números, indica la clasificación formal de un enzima)
ECM	matriz extracelular
EDTA	etilendiaminotetraacetato
EF	factor de elongación
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ELISA	ensayo por inmunoadsorbente unido a enzima
EM	microscopia electrónica
emf	fuerza electromotriz
EPO	eritropoyetina
ε	coeficiente de absorción molar
EST	señal de secuencia expresada
η	viscosidad
$\mathcal{F}$	faraday
f	coeficiente de fricción
FA	ácido graso
FAD, $FADH_2$	flavina adenina dinucleótido y su forma reducida

FAS	ácido graso sintasa
FBPasa-1	fructosa 1,6-bisfosfatasa
FBPasa-2	fructosa 2,6-bisfosfatasa
Fd	ferredoxina
FDNB (DNFB)	1-fluoro-2,4-dinitrobenceno
F_oF_1	ATP sintasa mitocondrial
FFA	ácido graso libre (sin esterificar)
FH	hipercolesterolemia familiar
fMet	*N*-formilmetionina
FMN, $FMNH_2$	flavina mononucleótido y su forma reducida
FOXO1	secuencia de inicio de la horquilla
FP	flavoproteína
F1P	fructosa 1-fosfato
F6P	fructosa 6-fosfato
FRAP	recuperación de la fluorescencia después de la fotodecoloración
FRET	transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
Fru	D-fructosa
ΔG	variación de energía libre
ΔG°	variación de energía libre estándar
$\Delta G'^\circ$	variación de energía libre estándar en el estado estándar bioquímico
$\Delta G^\ddagger$	energía de activación
ΔG_B	energía de unión
ΔG_p	variación de la energía libre de hidrólisis del ATP (potencial de fosforilación) en condiciones no estándar
G	guanina, guanosina o guanilato
g	aceleración debida a la gravedad
GABA	ácido γ-aminobutírico
Gal	D-galactosa
GalN	D-galactosamina
GalNAc	*N*-acetil-D-galactosamina
GAP	gliceraldehído 3-fosfato; proteína activadora de la GTPasa
GDH	glutamato deshidrogenasa
GEF	factor intercambiador de nucleótido de guanosina
GFP	proteína fluorescente verde
GH	hormona de crecimiento
GLC	cromatografía gas-líquido
Glc	D-glucosa
GlcA	ácido D-glucónico
GlcN	D-glucosamina
GlcNAc	*N*-acetil-D-glucosamina (también NAG)
GlcUA	ácido D-glucurónico
Gln	glutamina
Glu	glutamato
GLUT	transportador de glucosa
Gly	glicina
GMP, GDP, GTP	guanosina 5′-mono-, di-, trifosfato
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GPI	derivado glucosilado del fosfatidilinositol
G1P	glucosa 1-fosfato
G6P	glucosa 6-fosfato
G6PD	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GRK	receptor quinasa acoplado a proteína G
GSH, GSSG	glutatión y su forma oxidada
GSK3	glucógeno sintasa quinasa 3
ΔH	variación de entalpía
HA	proteína hemaglutinina
Hb, HbO_2	hemoglobina, oxihemoglobina
HDL	lipoproteína de densidad alta
H_2 folato	dihidrofolato (también, DHF)
H_4 folato	tetrahidrofolato (también, THF)
HIF	factor de transcripción inducible por hipoxia
His	histidina
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana (véase también VIH)
HMG-CoA	β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA
hnRNA	RNA nuclear heterogéneo
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HRE	elemento de respuesta a hormonas
Hsp	proteína de choque térmico
HTH	hélice-giro-hélice
Hyp	hidroxiprolina
I	inosina
IF	factor de inicio
Ig	inmunoglobulina
IgG	inmunoglobulina G
Ile	isoleucina
IMP, IDP, ITP	inosina 5′-mono-, di-, trifosfato
IP_3	inositol 1,4,5-trisfosfato
IR	infrarrojo
IRP	proteína reguladora del hierro
IRS-1, IRS-2	sustrato del receptor de insulina-1, -2
IS	secuencia de inserción
J	joule
JAK	Janus quinasa
K_a	constante de disociación ácida
K_d	constante de disociación
K_D	constante de difusión
K_{eq}	constante de equilibrio
K'_{eq}	constante de equilibrio en condiciones estándar
K_I	constante de inhibición
K_m	constante de Michaelis-Menten
k	constante de velocidad
k_{cat}	número de recambio
kb	kilobase
α-KG	α-cetoglutarato
kpb	kilopar de bases
lac	lactosa
λ	longitud de onda
LDH	lactato deshidrogenasa
LDL	lipoproteína de densidad baja
Leu	leucina
LH	hormona luteinizante
Lk	número de enlace
ln	logaritmo en base *e*
log	logaritmo en base 10
LT	leucotrieno
LTR	repetición terminal larga
Lys	lisina
M_r	masa molecular relativa
Man	D-manosa

MAPK	proteína quinasa asociada a la mitosis
Mb, MbO_2	mioglobina, oximioglobina
MCAD	acil-CoA deshidrogenasa de cadena media
MCM	mantenimiento del minicromosoma
mDNA	DNA mitocondrial
Met	metionina
MFP	proteína multifuncional (en la oxidación de ácidos grasos)
miRNA	micro-RNA
MODY	diabetes de aparición madura de los jóvenes
mRNA	RNA mensajero
MS	espectroscopia de masas
MSH	hormona estimuladora de melanocitos
μ	movilidad electroforética
Mur	ácido murámico
Mur2Ac	ácido *N*-acetilmurámico (también NAM)
NAD^+, NADH	nicotinamida adenina dinucleótido y su forma reducida
$NADP^+$, NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato y su forma reducida
NAG	*N*-acetilglucosamina (también GlcNAc)
NAM	ácido *N*-acetilmurámico (también MurNAc)
ncRNA	RNA no codificante
Neu5Ac	ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico)
NMN^+, NMNH	nicotinamida adenina mononucleótido y su forma reducida
NMP, NDP, NTP	nucleósido mono-, di-, trifosfato
NMR	resonancia magnética nuclear (también denominada RMN)
NO	óxido nítrico
OAA	oxalacetato
ORC	complejo de reconocimiento del origen
ORF	marco abierto de lectura
P	presión
P_i	ortofosfato inorgánico (fosfato inorgánico)
PAB o PABA	*p*-aminobenzoato
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	par de bases
PC	plastocianina; fosfatidilcolina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PDE	nucleótido cíclico fosfodiesterasa
PDH	piruvato deshidrogenasa
PE	fosfatidiletanolamina
PEP	fosfoenolpiruvato
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PET	tomografía de emisión de positrones
PFK	fosfofructoquinasa
PG	prostaglandina
2PGA	2-fosfoglicerato
3PGA	3-fosfoglicerato
pH	log $(1/[H^+])$
Phe	fenilalanina
PI	fosfatidilinositol
pI	punto isoeléctrico
PIP_2	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PK	proteína quinasa; piruvato quinasa
pK	log $(1/K)$
PKA	proteína quinasa dependiente de cAMP (proteína quinasa A)
PKB	proteína quinasa B (también Akt)
PKC	proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina (proteína quinasa C)
PKG	proteína quinasa dependiente de cGMP (proteína quinasa G)
PKU	fenilcetonuria
PLC	fosfolipasa C
PLP	piridoxal fosfato
pO_2	presión parcial de oxígeno
Pol	polimerasa (DNA o RNA)
PP_i	pirofosfato inorgánico
PP1	fosfoproteína fosfatasa 1
PPAR	receptor activado por proliferador de peroxisomas
PQ	plastoquinona
pRb	proteína del retinoblastoma
Pro	prolina
PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
PS	fosfatidilserina; fotosistema
$\Delta\Psi$	potencial eléctrico transmembrana
PTB	unión de fosfotirosina
PUFA	ácido graso poliinsaturado
Q	cociente de acción de masas
Q, QH_2	ubiquinona, ubiquinona reducida
Rb	gen del retinoblastoma (un gen supresor de tumores)
RC	centro de fotorreacción
RE	retículo endoplasmático
REL	retículo endoplasmático liso
RER	retículo endoplasmático rugoso
RF	factor de liberación; forma replicativa
RFLP	polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción
RGS	regulador de la señalización por proteína G
RIA	radioinmunoensayo
Rib	D-ribosa
RLK	quinasa de tipo receptor
RMN	resonancia magnética nuclear (también denominada NMR)
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNasa	ribonucleasa
ROS	especie de oxígeno reactiva; segmento exterior de los bastones
rRNA	RNA ribosómico
RSV	virus del sarcoma de Rous
RTK	receptor tirosina quinasa (receptor Tyr quinasa)
ΔS	variación de entropía
SAM	*S*-adenosilmetionina (también AdoMet)
SDS	dodecilsulfato sódico
SELEX	evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial
Ser	serina
SERCA	ATPasa de los retículos sarcoplamático y endoplasmático

sida	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SMC	mantenimiento estructural de cromosomas
SNARE	receptor de proteína asociada al sinaptosoma
SNP	polimorfismo de un solo nucleótido
snRNA	RNA nuclear pequeño
SREBP	proteína de unión al elemento de respuesta a esteroles
sRNA	RNA pequeño
SRP	partícula de reconocimiento de señal
STAT	transductor de señal y activador de la transcripción
STP	temperatura y presión estándar
STR	repetición en tándem corta
stRNA	RNA pequeño temporal
STS	sitio de secuencia marcada
SUR	receptor de sulfonilurea
T	timina, timidina o timidilato
T	temperatura absoluta
T2DM	diabetes mellitus de tipo 2
TBP	proteína de unión a TATA
TCA	ácido tricarboxílico
TFP	proteína trifuncional
THF	tetrahidrofolato (también H_4 folato)
Thr	treonina
TLC	cromatografía en capa fina
TMP, TDP, TTP	timidina 5′-mono-, di-, trifosfato
TMV	virus del mosaico del tabaco
TPI	triosa fosfato isomerasa
TPP	tiamina pirofosfato
tRNA	RNA de transferencia
Trp	triptófano
TX	tromboxano
Tyr	tirosina
U	uracilo, uridina o uridilato
UAS	secuencia activadora en 5′
UCP	proteína desacoplante
UDP-Gal	uridina difosfato galactosa (también UDP-galactosa)
UDP-Glc	uridina difosfato glucosa (también UDP-glucosa)
UMP, UDP, UTP	uridina 5′-mono-, di-, trifosfato
UQ	ubiquinona (coenzima Q; también CoQ)
UV	ultravioleta
V_m	potencial eléctrico transmembrana (potencial de membrana)
V_{max}	velocidad máxima
V_0	velocidad inicial
Val	valina
VDR	receptor de la vitamina D
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana (denominado también HIV)
VLDL	lipoproteína de densidad muy baja
WAT	tejido adiposo blanco
YAC	cromosoma artificial de levadura
Z	carga neta

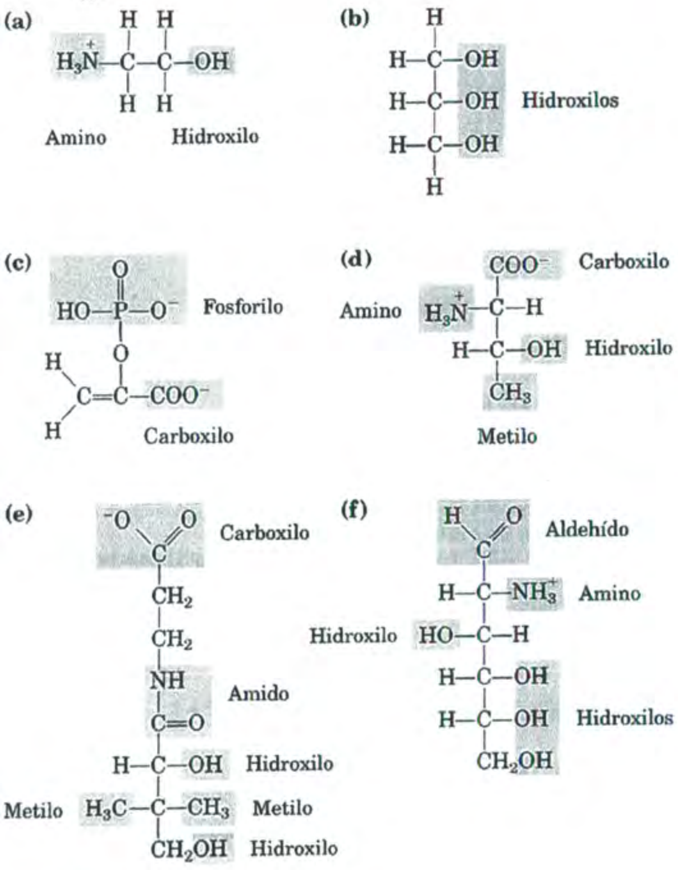
Apéndice B

Soluciones abreviadas de los problemas

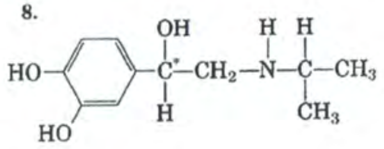
En *Absolute Study Guide to Accompany Principles of Biochemistry* se publican soluciones más completas a los problemas de todos los capítulos. En el caso de los problemas numéricos, las respuestas se expresan con el número correcto de figuras significativas.

Capítulo 1

1. **(a)** Diámetro de la célula amplificada = 500 mm **(b)** $2,7 \times 10^{12}$ moléculas de actina; **(c)** 36.000 mitocondrias **(d)** $3,9 \times 10^{10}$ moléculas de glucosa **(e)** 50 moléculas de glucosa por molécula de hexoquinasa
2. **(a)** 1×10^{-12} g = 1 pg **(b)** 10% **(c)** 5%
3. **(a)** 1,6 mm; 800 veces más largo que la célula; el DNA ha de estar fuertemente superenrollado. **(b)** 4.000 proteínas
4. **(a)** La velocidad metabólica está limitada por difusión, limitada ésta por el área superficial. **(b)** 12 μm^{-1} para la bacteria; 0,04 μm^{-1} para la ameba; la razón superficie-volumen es 300 veces superior en la bacteria.
5. **(a)** 2×10^{6} s (unos 23 días)
6. Las moléculas de vitamina de las dos fuentes son idénticas; el cuerpo no puede distinguir el origen; sólo las impurezas asociadas podrían variar con la fuente.
7.

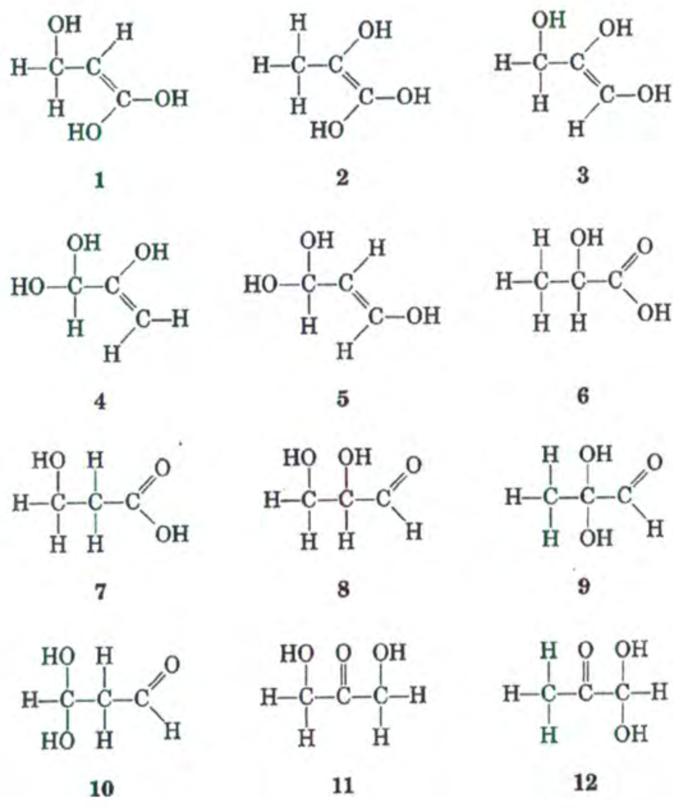


8.



Los dos enantiómeros tienen diferentes interacciones con un "receptor" biológico quiral (una proteína).

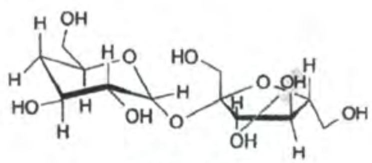
9. **(a)** Sólo los aminoácidos tienen grupos amino; la separación se podría basar en la carga o en la afinidad de fijación de estos grupos. Los ácidos grasos son menos solubles en agua que los aminoácidos, y los dos tipos de moléculas también difieren en tamaño y forma; cualquiera de estas diferencias en sus propiedades podría constituir la base de su separación. **(b)** La glucosa es una molécula más pequeña que un nucleótido; la separación podría basarse en el tamaño. La base nitrogenada y/o el grupo fosfato también proporcionan a los nucleótidos características (solubilidad, carga) que podrían utilizarse para separarlos de la glucosa.
10. Es improbable que el silicio pudiese servir como elemento organizador central de la vida en una atmósfera con oxígeno tal como es la Tierra. No se sintetizan fácilmente largas cadenas de átomos de silicio; no se formarían fácilmente las macromoléculas poliméricas necesarias para funciones más complejas. El oxígeno rompe los enlaces entre los átomos de silicio y los enlaces silicio-oxígeno son muy estables y difíciles de romper, lo que impide la formación y rotura de enlaces esenciales para la vida.
11. Sólo un enantiómero del fármaco era fisiológicamente activo. La dexedrina consistía en ese único enantiómero; la bencedrina era una mezcla racémica.
12. **(a)** 3 grupos ácido fosfórico; α-D-ribosa; guanina **(b)** Colina; ácido fosfórico; glicerol, ácido oleico; ácido palmítico **(c)** Tirosina; 2 glicinas; fenilalanina; metionina
13. **(a)** CH_2O; $C_3H_6O_3$
    (b)



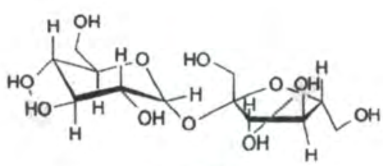
(c) X contiene un centro quiral; quedan eliminados todos excepto **6** y **8**. **(d)** X contiene un grupo funcional ácido; se elimina **8**; la estructura **6** cumple todos lo criterios. **(e)** Estructura **6**; no distinguimos entre los dos enantiómeros posibles.

14. **(a)** Una $\Delta G°$ más negativa corresponde a una K_{eq} mayor para la reacción de unión por lo que el equilibrio se desplaza hacia productos y unión más fuerte y, por lo tanto, mayor dulzor y MRS más elevado. **(b)** Los ensayos de dulzor basados en animales duran mucho tiempo. Un programa informático para predecir la dulzor, aunque no fuese siempre preciso, permitiría a los químicos diseñar edulcorantes mucho más rápidamente. Se podrían probar entonces las moléculas candidatas con el ensayo convencional. **(c)** El intervalo 0,25 a 0,4 nm corresponde a la longitud de unos 1,5 a 2,5 enlaces sencillos. Se puede utilizar la figura que sigue para construir una regla aproximada; cualquier átomo dentro del rectángulo rosa se encuentra entre 0,25 y 0,4 nm del origen de la regla.

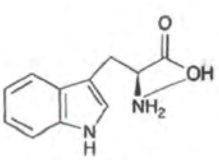
En las moléculas hay muchos grupos AH-B posibles; aquí se muestran unos cuantos.



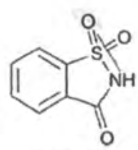
Desoxisacarosa



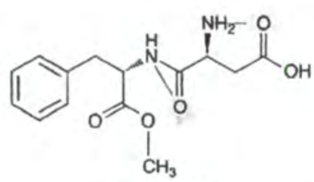
Sacarosa



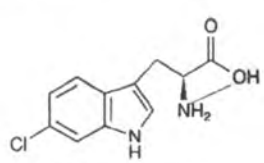
D-Triptófano



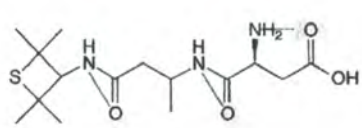
Sacarina



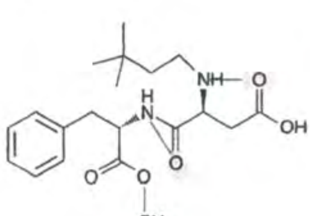
Aspartame



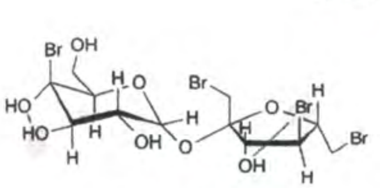
6-Cloro-D-triptófano



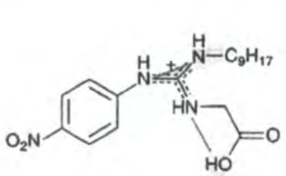
Alitame



Neotame



Tetrabromosacarosa



Ácido sacarónico

(d) Primero, cada molécula tiene múltiples grupos AH-B, por lo que es difícil conocer cuál es el importante. Segundo, debido a que el motivo AH-B es muy sencillo, este grupo tendrá muchas moléculas no dulces. **(e)** Sacarosa y desoxisacarosa. La desoxisacarosa carece de uno de los grupos AH-B presentes en la sacarosa y tiene un MRS ligeramente inferior que la sacarosa, tal como sería de esperar si los grupos AH-B son importantes para la dulzor. **(f)** Hay muchos ejemplos de este tipo; aquí hay unos cuantos: (1) D-Triptófano y 6-cloro-D-triptófano tienen el mismo grupo AH-B pero valores de MRS muy diferentes. (2) Aspartame y neotame tienen los mismos grupos AH-B pero valores de MRS muy diferentes. (3) El neotame tiene dos grupos AH-B y el alitame tiene tres y, sin embargo, el neotame es cinco veces más dulce que el alitame. (4) El bromo es menos electronegativo que el oxígeno, por lo que se espera que debilite un grupo AH-B y sin embargo la tetrabromosacarosa es mucho más dulce que la sacarosa. **(g)** Si se "retuercen" suficientemente los parámetros, se puede conseguir que cualquier modelo se adapte a un conjunto de datos definido. Dado que el objetivo era crear un modelo para predecir la $\Delta G°$ de moléculas no ensayadas in vivo, los investigadores tuvieron que demostrar que el modelo funcionaba bien con moléculas con las que no se había trabajado. El grado de imprecisión con la prueba daría una idea de cómo se comportaría el modelo con nuevas moléculas. **(h)** MRS está relacionado con K_{eq}, la cual está relacionada exponencialmente con $\Delta G°$, por lo que al añadir una cantidad constante a $\Delta G°$ multiplica el MRS por un valor constante. Basándose en los valores dados con las estructuras una variación de $\Delta G°$ de 1,3 kcal/mol corresponde a una variación de 10 veces en el MRS.

Capítulo 2

1. El etanol es polar; el etano no lo es. El grupo —OH del etanol puede formar enlace de hidrógeno con el agua.

2. **(a)** 4,76 **(b)** 9,19 **(c)** 4,0 **(d)** 4,82

3. **(a)** $1{,}51 \times 10^{-4}$ M **(b)** $3{,}02 \times 10^{-7}$ M **(c)** $7{,}76 \times 10^{-12}$ M

4. 1,1

5. **(a)** $HCl \rightleftharpoons H^+ + Cl^-$ **(b)** 3.3 **(c)** $NaOH \rightleftharpoons Na^+ + OH^-$ **(d)** 9,8

6. 1,1

7. $1{,}7 \times 10^{-9}$ mol de acetilcolina

8. HCl 0,1 M

9. 3,3 mL

10. **(a)** $RCOO^-$ **(b)** RNH_2 **(c)** $H_2PO_4^-$ **(d)** HCO_3^-

11. **(a)** 5,06 **(b)** 4,28 **(c)** 5,46 **(d)** 4,76 **(e)** 3,76

12. **(a)** HCl 0,1 M **(b)** NaOH 0,1 M **(c)** NaOH 0,1 M

13. (d) El bicarbonato, una base débil, valora —OH a —O⁻, con lo que el compuesto se hace más polar y más hidrosoluble.

14. Estómago; la forma neutra de la aspirina presente al pH más bajo es menos polar y puede pasar más fácilmente a través de la membrana citoplasmática.

15. 9

16. 7,4

17. **(a)** pH 8,6 a 10,6 **(b)** 4/5 **(c)** 10 mL **(d)** pH = $pK_a - 2$

18. 1,4

19. $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 5,8 g/L; Na_2HPO_4, 8,2 g/L

20. $[A^-]/[HA] = 0{,}10$

21. Mezcle 150 mL de acetato sódico 0,10 M y 850 mL de ácido acético 0,10 M.

22. Ácido acético; su pK_a es el más cercano al pH deseado.

23. **(a)** 4,6 **(b)** 0,1 unidad de pH **(c)** 4 unidades de pH

24. 4,3

25. Acetato 0,13 M y ácido acético 0,07 M

26. 1,7

27. 7

28. **(a)**

Totalmente protonado Totalmente desprotonado

(b) totalmente protonado **(c)** zwitterion **(d)** zwitterion **(e)** totalmente desprotonado

29. **(a)** El pH de la sangre está controlado por el sistema del tampón dióxido de carbono-bicarbonato, $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$. Durante la *hipoventilación*, la $[CO_2]$ aumenta en los pulmones y en la sangre arterial, desplazando el equilibrio hacia la derecha, aumentando la $[H^+]$ y disminuyendo el pH. **(b)** Durante la *hiperventilación*, la $[CO_2]$ disminuye en los pulmones y en la sangre arterial, reduciendo la $[H^+]$ y aumentando el pH por encima del valor normal de 7,4. **(c)** El lactato es un ácido moderadamente fuerte, disociándose completamente en condiciones fisiológicas y disminuyendo así el pH de la sangre y del tejido muscular. La hiperventilación elimina H^+, aumentando el pH de la sangre y tejidos como anticipación a la acumulación de ácido.

30. 7,4

31. La disolución de más CO_2 en la sangre hace aumentar la $[H^+]$ en la sangre y en los fluidos extracelulares, lo que disminuye el pH:
$CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$

32. **(a)** Utilice la sustancia en su forma emulgente para emulsionar el aceite vertido, recoja el aceite emulsionado y a continuación pase a la forma no emulgente. El aceite y el agua se separan y se puede recoger el aceite para su uso posterior. **(b)** El equilibrio se encuentra muy desplazado a la derecha. El ácido más fuerte (menor pK_a), H_2CO_3, cede un protón a la base conjugada del ácido más débil (mayor pK_a), la amidina. **(c)** La fuerza de un emulgente depende de la hidrofilicidad de sus grupos de cabeza: cuanto más hidrofílicos, más potente es el emulgente. La forma amidinio de s-tens es mucho más hidrofílica que la forma amidina, por lo que es un emulgente más potente. **(d)** *Punto A:* amidinio; el CO_2 ha tenido mucho tiempo para reaccionar con la amidina para dar la forma amidinio. *Punto B:* amidina; Ar ha eliminado el CO_2 de la solución, dejando la forma amidina. **(e)** La conductividad aumenta a medida que la amidina sin carga reacciona con el CO_2 para dar la forma amidinio. **(f)** La conductividad disminuye a medida que Ar elimina el CO_2 desplazando el equilibrio hacia la forma amidina sin carga. **(g)** Trate s-tens con CO_2 para producir la forma amidinio del emulgente y utilícelo para emulsionar el vertido. Trate la emulsión con Ar para eliminar el CO_2 y producir la forma amidina no emulgente. El aceite se separará del agua con lo que se puede recuperar.

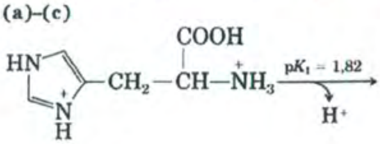
Capítulo 3

1. L; determine la configuración absoluta en el carbono α y compárelo con D- y L-gliceraldehído.

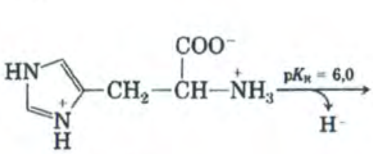
2. **(a)** I **(b)** II **(c)** IV **(d)** II **(e)** IV **(f)** II y IV **(g)** III **(h)** III **(i)** V **(j)** III **(k)** V **(l)** II **(m)** III **(n)** V **(o)** I, III y V

3. **(a)** pI > pK_a del grupo α-carboxilo y pI < pK_a del grupo α-amino, por lo que los dos grupos están cargados (ionizados). **(b)** 1 en $2{,}19 \times 10^7$. El pI de la alanina es 6,01. A partir de la Tabla 3-1 y de la ecuación de Henderson-Hasselbalch se deduce que 1/4.680 grupos carboxilo y 1/4.680 grupos amino están sin carga. La fracción de moléculas de alanina con ambos grupos sin carga es el producto de estas fracciones.

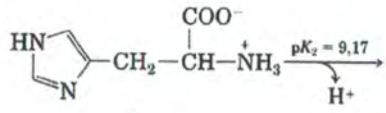
4. **(a)–(c)**



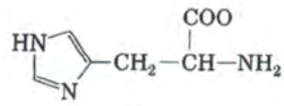
1



2



3

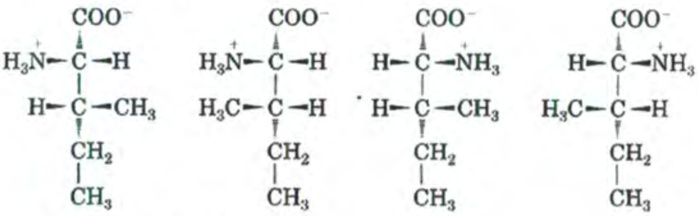


4

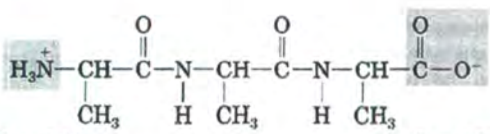
pH	Estructura	Carga neta	Migra hacia
1	**1**	+2	Cátodo
4	**2**	+1	Cátodo
8	**3**	0	No migra
12	**4**	−1	Ánodo

5. **(a)** Asp **(b)** Met **(c)** Glu **(d)** Gly **(e)** Ser

6. **(a)** 2 **(b)** 4 **(c)**



7. **(a)** Estructura a pH 7:



$pK_2 = 8{,}03$ $pK_1 = 3{,}39$

(b) La interacción electrostática entre el anión carboxilato y el grupo amino protonado del zwitterion de la alanina afecta favorablemente a la ionización del grupo carboxilo. Esta interacción electrostática favorable disminuye a medida que aumenta la longitud de la poli(Ala), con el resultado de un incremento en pK_1. **(c)** La ionización del grupo amino protonado destruye la interacción electrostática favorable observada en (b). Con el aumento de la distancia entre los grupos cargados, la eliminación del protón del grupo amino en poli(Ala) es más fácil y así el pK_2 es menor. Los efectos intramoleculares de los enlaces amida (enlace peptídico) mantienen los valores de pK_a por debajo de lo que habrían de ser para una amina sustituida con un alquilo.

8. 75.000

9. **(a)** 32.000. Se pierden los elementos del agua cuando se forma un enlace peptídico, por lo que la masa molecular de un residuo Trp no es la misma que la masa molecular del triptófano libre. **(b)** 2

10. La proteína tiene cuatro subunidades, con masas moleculares de 160, 90, 90 y 60 kDa. Las dos subunidades de 90 kDa (posiblemente idénticas) están unidas por uno o más enlaces disulfuro

11. **(a)** a pH 3, +2; a pH 8, 0; a pH 11, −1 **(b)** pI = 7,8

12. pI ≈ 1; grupos carboxilato; Asp y Glu

13. Lys, His, Arg; los grupos fosfato del DNA cargados negativamente interaccionan con grupos laterales de las histonas cargados positivamente.

14. **(a)** $(Glu)_{20}$ **(b)** $(Lys\text{-}Ala)_3$ **(c)** $(Asn\text{-}Ser\text{-}His)_5$ **(d)** $(Asn\text{-}Ser\text{-}His)_5$

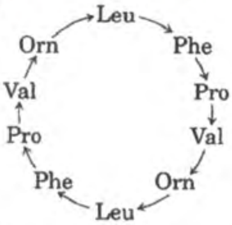
15. **(a)** La actividad específica después del paso 1 es de 200 unidades/mg; del paso 2, 600 unidades/mg; del paso 3, 250 unidades/mg; del paso 4, 4.000 unidades /mg; del paso 5, 15.000 unidades/mg; y del paso 6, 15.000 unidades/mg **(b)** Paso 4 **(c)** Paso 3 **(d)** Sí. La actividad específica no aumentó en el paso 6; electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

16. **(a)** [NaCl] = 0,5 mM **(b)** [NaCl] = 0,05 mM.

17. C eluye primero, B segundo y A el último.

18. Tyr–Gly–Gly–Phe–Leu

19.



Las flechas corresponden a la orientación de los enlaces peptídicos, —CO → NH—.

20. 88%, 97%. El porcentaje (x) de residuos aminoácidos correctos liberados en el ciclo n es x_n/x. Todos los residuos liberados en el primer ciclo son correctos, incluso si la eficiencia de la rotura no es perfecta.

21. **(a)** Y (1), F (7) y R (9) **(b)** Posiciones 4 y 9; K (Lys) es más común en 4, R (Arg) es invariable en la posición 9 **(c)** Posiciones 5 y 10; E (Glu) es más frecuente en ambas posiciones **(d)** Posición 2; S (Ser)

22. **(a)** La proteína que se ha de aislar (citrato sintasa, CS) es una fracción relativamente pequeña de la proteína celular total. Las temperaturas frías reducen la degradación de proteínas; la sacarosa proporciona un ambiente isotónico que mantiene la integridad de los orgánulos durante la homogenización. **(b)** Este paso separa los orgánulos en base al tamaño relativo. **(c)** La primera adición de sulfato amónico elimina algunas proteínas no deseadas del homogenado. Más sulfato amónico precipita CS. **(d)** Para resuspender (solubilizar) la CS, se ha de eliminar el sulfato amónico en condiciones de pH y fuerza iónica que favorezcan la conformación nativa. **(e)** Las moléculas de CS son mayores que el tamaño de poro del gel cromatográfico. La proteína se detecta a 280 nm debido a la absorción a esta longitud de onda de los residuos Tyr y Trp. **(f)** La CS tiene una carga positiva y de este modo se une a la columna de intercambio catiónico cargada negativamente. Después de haber pasado las proteínas neutras y cargadas negativamente, la CS se desplaza de la columna utilizando la solución de lavado de pH más elevado, lo que altera la carga de la CS. **(g)** Diferentes proteínas pueden tener el mismo pI. El gel con SDS confirmó que se había purificado una única proteína. El SDS es difícil de eliminar completamente de una proteína y su presencia distorsiona las propiedades ácido-base de la proteína, incluido el pI.

23. **(a)** Cualquier cadena polipeptídica lineal sólo tiene dos clases de grupo amino libres: un único grupo α-amino en el extremo amino y un grupo ε-amino en cada residuo Lys presente. Estos grupos amino reaccionan con el FDNB formando derivados DNP-aminoácido. La insulina dio dos derivados α-DNP-aminoácido diferentes, lo que sugiere que tiene dos extremos amino y, por consiguiente, dos cadenas polipeptídicas, una con una Gly amino-terminal y la otra con una Phe amino-terminal. Dado que el producto DNP-lisina es α-DNP-lisina, la Lys no es un amino-terminal. **(b)** Sí. La cadena A tiene Gly amino-terminal; la cadena B tiene Phe amino-terminal y el residuo 29 (no terminal) de la cadena B es Lys. **(c)** Phe–Val–Asp–Glu. El péptido B1 muestra que el residuo amino-terminal es Phe. El péptido B2 también incluye Val, pero dado que no se forma DNP-Val, ésta no es el amino-terminal; ha de estar en el lado carboxilo de Phe. Así, la secuencia de B2 es DNP–Phe–Val. De modo semejante, la secuencia de B3 ha de ser DNP–Phe–Val–Asp y la secuencia de la cadena A ha de empezar Phe–Val–Asp–Glu–. **(d)** No. La secuencia amino-terminal conocida de la cadena A es Phe–Val–Asn–Gln–. En el análisis de Sanger la Asn y la Gln aparecen como Asp y Glu debido a que el paso de hidrólisis vigorosa en ⑦ hidroliza los enlace amida de Asn y Gln (así como los enlaces peptídicos), formando Asp y Glu. Sanger y colaboradores no pudieron distinguir Asp de Asn y Glu de Gln en esta fase de su análisis. **(e)** La secuencia concuerda exactamente con la de la Fig. 3-24. Cada péptido de la tabla da información específica sobre qué residuos Asx son Asn o Asp y qué residuos Glx son Glu o Gln.

Ac1: residuos 20–21. Ésta es la única secuencia Cys–Asx en la cadena A; hay ~1 grupo amido en el péptido, por lo que ha de ser Cys–Asn:

N–Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–Cys–Ser–
1 5 10
Leu–Tyr–Glx–Leu–Glx–Asx–Tyr–Cys–Asn–C
15 20

Ap15: residuos 14–15–16. Es el único Tyr–Glx–Leu en la cadena A; hay ~1 grupo amido, por lo que el péptido ha de ser Tyr–Gln–Leu:

N–Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–Cys–Ser–
1 5 10
Leu–Tyr–Gln–Leu–Glx–Asx–Tyr–Cys–Asn–C
15 20

Ap14: residuos 14–15–16–17. Tiene ~1 grupo amido y ya sabemos que el residuo 15 es Gln, por lo que el residuo 17 ha de ser Glu:

N–Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–Cys–Ser–
1 5 10
Leu–Tyr–Gln–Leu–Glu–Asx–Tyr–Cys–Asn–C
15 20

Ap3: residuos 18–19–20–21. Tiene ~2 grupos amido y ya sabemos que el residuo 21 es Asn, por lo que el residuo 18 ha de ser Asn:

N–Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–Cys–Ser–
1 5 10
Leu–Tyr–Gln–Leu–Glu–Asn–Tyr–Cys–Asn–C
15 20

Ap1: residuos 17–18–19–20–21, que concuerda con que los residuos 18 y 21 sean Asn.

Ap5pa1: residuos 1–2–3–4. Tiene ~0 grupos amido, por lo que el residuo 4 ha de ser Glu:

Leu–Tyr–Gln–Leu–Glu–Asn–Tyr–Cys–Asn–C
15 20
Leu–Tyr–Gln–Leu–Glu–Asn–Tyr–Cys–Asn–C
15 20

Ap5: residuos 1 a 13. Tiene ~1 grupo amido, y ya sabemos que el residuo 14 es Glu, por lo que el residuo 5 ha de ser Gln:

N–Gly–Ile–Val–Glu–Gln–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–Cys–Ser–
1 5 10
Leu–Tyr–Gln–Leu–Glu–Asn–Tyr–Cys–Asn–C
15 20

Capítulo 4

1. **(a)** Los enlaces más cortos son más fuertes y tienen un orden de enlace mayor (son múltiples en lugar de sencillos). El enlace peptídico C—N es más fuerte que un enlace sencillo y se encuentra a medio camino, en carácter, entre un enlace sencillo y uno doble. **(b)** La rotación alrededor del enlace peptídico es difícil a temperaturas fisiológicas debido a su carácter parcial de doble enlace.

2. **(a)** Las principales unidades estructurales en los polipéptidos de las fibras de lana (α-queratina) son vueltas de la hélice α espaciadas a intervalos de 5,4 Å. Los enrollamientos superhelicoidales producen el espaciado de 5,2 Å. El sometimiento al vapor caliente y al estiramiento de la fibra da lugar a una cadena polipeptídica extendida con la conformación β en la que la distancia entre los grupos R adyacentes es de unos 7,0 Å. A medida que el polipéptido recupera su estructura α-helicoidal la fibra se acorta. **(b)** La lana tratada se encoje cuando las cadenas polipeptídicas se convierten de la forma β extendida a la conformación nativa α-helicoidal con calor húmedo. Las hojas β-plegadas de la seda, con sus cadenas laterales de los aminoácidos más pequeñas y muy empaquetadas, son más estables que las de la lana.

3. Unos 42 enlaces peptídicos por segundo.

4. A pH > 6, los grupos carboxilo del poli(Glu) se desprotonan; la repulsión entre los grupos carboxilato cargados negativamente conduce al desplegamiento. De modo parecido, a pH 7, los grupos amino de la poli(Lys) están protonados; la repulsión entre estos grupos cargados positivamente también produce el desplegamiento.

5. **(a)** Los enlaces disulfuro son enlaces covalentes que son mucho más fuertes que las interacciones no covalentes que estabilizan la mayoría de proteínas. Entrecruzan las cadenas proteicas, incrementando su rigidez, fuerza mecánica y dureza. **(b)** Los residuos cistina (enlaces disulfuro) impiden el desplegamiento completo de la proteína.

6. **(a)** Las curvaturas son más probables en los residuos 7 y 19; los residuos Pro en la configuración *cis* acomodan bien los giros. **(b)** Los residuos Cys en las posiciones 13 y 24 pueden formar enlaces disulfuro. **(c)** Superficie externa: residuos polares y cargados (Asp, Gln, Lys); interior: residuos apolares y alifáticos (Ala, Ile); la Thr, aunque es polar, tiene un índice hidropático próximo a cero, por lo que se puede encontrar tanto en la superficie externa como en el interior de la proteína.

7. 30 residuos aminoácidos; 0,87

8. La mioglobina es las tres cosas. La estructura plegada, el "pliegue de globina", es un motivo que se encuentra en todas las globinas. El polipéptido se pliega en un único dominio que, para esta proteína representa la estructura tridimensional completa.

9. El enzima bacteriano es una colagenasa; destruye la barrera del tejido conjuntivo del huésped, permitiendo a la bacteria invadir los tejidos del huésped. Las bacterias no contienen colágeno.

10. **(a)** El número de moles de DNP-valina formados por mol de proteína es igual al número de extremos amino y, por tanto, al número de cadenas polipeptídicas. **(b)** 4 **(c)** Diferentes cadenas correrían probablemente como bandas discretas en un gel de poliacrilamida con SDS.

11. (a); tiene más residuos aminoácidos que favorecen la estructura α-helicoidal (véase la Tabla 4–1).

12. **(a)** Los residuos aromáticos parecen jugar un papel importante en la estabilización de las fibras amiloides. Así, moléculas con sustituyentes aromáticos pueden impedir la formación de amiloide al interferir con el apilamiento o asociación de las cadenas laterales aromáticas. **(b)** El amiloide se forma en el páncreas asociado a la diabetes de tipo 2, lo mismo que en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer. Aunque en las fibrillas de amiloide de las dos enfermedades intervienen proteínas diferentes, la estructura fundamental del amiloide es similar estabilizándose de modo similar en ambas por lo que son dianas potenciales de medicamentos similares diseñados para destruir su estructura.

13. **(a)** Factor de transcripción NFκB también llamado factor de transformación. **(b)** No. Obtendrá resultados similares pero con otras proteínas relacionadas con las de la lista. **(c)** La proteína tiene dos subunidades. Existen múltiples variantes de las subunidades, siendo las mejor caracterizadas las de 50, 52 y 65 kDa. Éstas se aparean entre sí formando una serie de homo y heterodímeros. En el PDB se pueden encontrar las estructuras de diversas variantes diferentes. **(d)** El factor de transcripción NFκB es una proteína dimérica que se une a secuencias específicas de DNA, incrementando la transcripción de genes próximos. Uno de esos genes es la cadena ligera κ de la inmunoglobulina, de la que el factor de transcripción obtiene su nombre.

14. **(a)** Aba es un reemplazamiento adecuado porque Aba y Cys tienen una cadena lateral del mismo tamaño y su hidrofobicidad es parecida. No obstante, Aba no puede formar enlaces disulfuro, por lo que no será un reemplazante adecuado si se necesitan estos enlaces. **(b)** Hay muchas diferencias entre la proteína sintetizada y la proteasa VIH producida por una célula humana, cualquiera de las cuales podría dar lugar a un enzima sintético inactivo: (1) Aunque Aba y Cys tienen tamaño e hidrofobicidad similares, puede ser que Aba no sea suficientemente parecida para que la proteína se pliegue de manera adecuada. (2) La proteasa VIH puede necesitar enlaces disulfuro para que funcione bien. (3) Muchas proteínas sintetizadas por los ribosomas se pliegan a medida que se producen; la proteína en este estudio se plegó sólo después de completarse la cadena. (4) Las proteínas sintetizadas por los ribosomas pueden interaccionar con los ribosomas mientras se pliegan; esto no es posible para la proteína estudiada. (5) El citosol es una solución más compleja que el tampón utilizado en el estudio; algunas proteínas pueden requerir proteínas específicas desconocidas para un plegamiento correcto. (6) Las proteínas sintetizadas en las células a menudo necesitan chaperonas para plegarse bien; éstas no se encuentran en el tampón del estudio. (7) En las células, la proteasa VIH se sintetiza formando parte de una cadena más grande que luego se modifica proteolíticamente; la proteína del estudio se sintetizó como una molécula sencilla. **(c)** Debido a que el enzima *es* funcional cuando Aba sustituye a Cys, los enlaces disulfuro no son importantes en la estructura de la proteasa VIH. **(d)** *Modelo 1:* se plegaría como la L-proteasa. *Argumento a favor:* la estructura covalente es la misma (excepto la quiralidad) por lo que debería plegarse como la L-proteasa. *Argumento en contra:* la quiralidad no es un detalle trivial; la forma tridimensional es una característica clave de las moléculas biológicas. El enzima sintético no se plegaría como la L-proteasa. *Modelo 2:* se plegaría como la imagen especular de la L-proteasa. *A favor:* dado que los componentes individuales son imágenes especulares de las de la proteína biológica, se plegará como la imagen especular. *En contra:* las interacciones implicadas en el plegamiento de las proteínas son muy complejas, por lo que muy probablemente la proteína sintética se plegará de modo diferente. *Modelo 3:* se plegaría dando algo diferente. *A favor:* las interacciones que intervienen en el plegamiento proteico son muy complejas, por lo que probablemente la proteína sintética se plegará en otra forma. En contra: dado que los componentes individuales son imágenes especulares de los de la proteína biológica, se plegará en una forma especular. **(e)** *Modelo 1:* el enzima es activo, pero con la forma enantiomérica del sustrato biológico y es inhibido por la forma enantiomérica del inhibidor biológico. Está de acuerdo con que la D-proteasa es la imagen especular de la L-proteasa. **(f)** El azul Evans es aquiral; se une a ambas formas del enzima. **(g)** No. Dado que las proteasas sólo contienen L-aminoácidos y sólo reconocen L-péptidos, la quimotripsina no digerirá la D-proteasa. **(h)** No necesariamente. Según el enzima concreto, cualquiera de los problemas señalados en (b) podría dar como resultado un enzima inactivo.

Capítulo 5

1. La proteína B tiene una mayor afinidad hacia el ligando X; estará semisaturada a una concentración de X mucho más baja que la de la proteína A. La proteína A tiene una $K_a = 10^6$ M^{-1}; la B tiene una $K_a = 10^9$ M^{-1}.

2. **(a), (b)** y **(c)** Las tres tienen $n_H < 1{,}0$. La cooperatividad negativa aparente en la fijación del ligando puede ser debida a la presencia de dos o más tipos de sitios de fijación de ligando con diferentes afinidades hacia el ligando sobre la misma o diferentes proteínas en la misma solución. La cooperatividad negativa aparente también se observa frecuentemente en preparaciones proteicas heterogéneas. Hay unos pocos casos bien documentados de cooperatividad negativa verdadera.

3. **(a)** disminuye **(b)** aumenta **(c)** disminuye **(d)** aumenta

4. $k_d = 8{,}9 \times 10^{-5}$ s^{-1}

5. El comportamiento cooperativo de la hemoglobina proviene de interacciones entre las subunidades.

6. **(a)** La observación de que la hemoglobina A (HbA; materna) está sólo saturada en un 60% cuando la pO_2 es 4 kPa, mientras que la hemoglobina F (HbF; fetal) lo está en más de un 90% en las mismas condiciones fisiológicas, indica que la afinidad por el O_2 de la HbF es mayor que la de la HbA. **(b)** La mayor afinidad de la HbF por el O_2 asegura que el oxígeno fluirá desde la sangre materna a la fetal en la placenta. La sangre fetal se acerca a la saturación absoluta en condiciones en las que la afinidad de la HbA por el O_2 es baja. **(c)** La observación de que la curva de saturación de O_2 de la HbA experimenta un desplazamiento mayor al fijarse el BPG que la HbF sugiere que la HbA fija el BPG más fuertemente que la HbF. La fijación diferencial del BPG a las dos hemoglobinas puede determinar la diferencia en sus afinidades por el O_2.

7. **(a)** Hb Memphis **(b)** HbS, Hb Milwaukee, Hb Providence, quizá Hb Cowtown **(c)** Hb Providence

8. Más fuertemente. La incapacidad para formar tetrámeros limitaría la cooperatividad de estas variantes y la curva de unión sería más hiperbólica. Además, el sitio de unión de BPG estaría destruido. La unión de oxígeno sería probablemente más fuerte porque en ausencia de BPG el estado por defecto es estado R de unión fuerte.

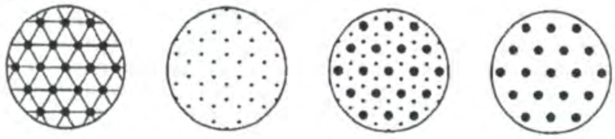
9. **(a)** 1×10^{-8} M **(b)** 5×10^{-8} M **(c)** 8×10^{-8} M **(d)** 2×10^{-7} M. Nótese que un reordenamiento de la Ec. 5–8 da $[L] = \theta K_d/(1-\theta)$.

10. El epítopo será probablemente una estructura sepultada cuando se polimeriza la actina G para dar actina F.

11. Muchos patógenos, incluido el VIH, han desarrollado mecanismos mediante los cuales pueden alterar repetidamente las proteínas superficiales a las que se unen inicialmente los componentes del sistema inmune. Así el organismo huésped se enfrenta regularmente con nuevos antígenos y requiere tiempo para desencadenar la respuesta inmune a cada uno. A medida que el sistema inmune responde a una variante, ya se están creando nuevas variantes.

12. La unión del ATP a la miosina desencadena la disociación de la miosina del filamento de actina delgado. En ausencia de ATP, la actina y la miosina están fuertemente unidas.

13.

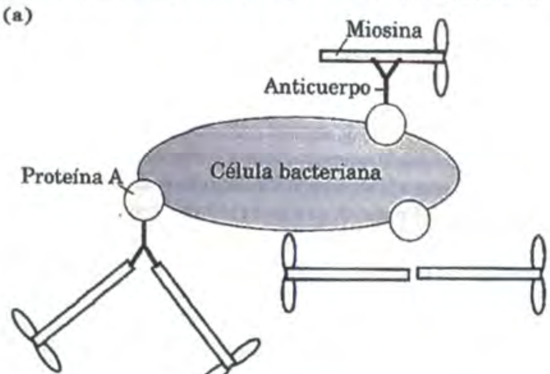


(a) (b) (c) (d)

14. **(a)** La cadena L es la cadena ligera y la cadena H es la cadena pesada del fragmento Fab de esta molécula de anticuerpo. La cadena Y es la lisozima. **(b)** Las estructuras β son predominantes en las regiones variable y constante del fragmento. **(c)** Fragmento de la cadena pesada de Fab, 218 residuos aminoácidos; fragmento cadena ligera, 214 residuos; lisozima, 129 residuos. Menos del 15 % de la molécula de lisozima está en contacto con el fragmento Fab. **(d)** En la cadena H, entre los residuos que parecen estar en contacto con la lisozima se encuentran Gly^{31}, Tyr^{32}, Asp^{99}, Asp^{100} y Tyr^{101}. En la cadena L entre los residuos que parecen estar en contacto con la lisozima se encuentran Tyr^{32}, Tyr^{49}, Tyr^{50} y Trp^{92}. En la lisozima parece que los residuos Asn^{19}, Gly^{22}, Tyr^{23}, Ser^{24}, Lys^{116}, Gly^{117}, Thr^{118}, Asp^{119}, Gln^{121} y Arg^{125} están situados en la interfase antígeno-anticuerpo. No todos estos residuos son adyacentes en la estructura primaria. El plegamiento de la cadena polipeptídica en niveles de estructura superiores hace que residuos no consecutivos estén juntos formando el sitio de fijación del antígeno.

15. **(a)** La proteína con una K_d de 5 μM tendrá la afinidad más elevada hacia el ligando L. Cuando la K_d es 10 μM, la duplicación en la [L] desde 0,2 a 0,4 μM (valores muy por debajo de K_d) casi doblará θ (el aumento real es de 1,96). Esto es una propiedad de la curva hiperbólica; a bajas concentraciones de ligando, la θ es una función casi lineal de [L]. Por otro lado, el hecho de doblar [L] desde 40 a 80 μM (muy por encima de K_d, donde la curva de fijación se acerca a su límite asintótico) producirá un aumento de θ por un factor de 1,1. Los factores incrementales son idénticos para las curvas generadas por la Ec. 5–11. **(b)** $\theta = 0{,}998$. **(c)** Se obtendrán una serie de respuestas según sean los valores introducidos para los diferentes parámetros.

16. **(a)**



El dibujo no es a escala; cualquier célula tendría más moléculas de miosina en su superficie. **(b)** Se necesita ATP para proporcionar la energía química que impulse el movimiento (véase el Capítulo 13). **(c)** Un anticuerpo que se una a la cola de miosina, el sitio de unión de actina, bloquearía la unión de la actina e impediría el movimiento. Un anticuerpo que se una a la actina también impediría la interacción actina-miosina y, por tanto, el movimiento. **(d)** Hay dos explicaciones posibles: (1) la tripsina sólo rompe en los residuos Lys y Arg (véase la Tabla 3–7) por lo que no cortaría en muchos sitios de la proteína. (2) No todos los residuos Arg o Lys son igualmente accesibles a la tripsina; los sitios más expuestos se romperían en primer lugar. **(e)** El modelo S1. El modelo de charnela predice que los complejos cuenta-anticuerpo-HMM (con la charnela) se moverían, pero los complejos cuenta-anticuerpo-SHMM (sin charnela) no se moverían. El modelo S1 predice que debido a que ambos modelos incluyen S1, ambos deberían moverse. El hallazgo de que las cuentas se mueven con SHMM (sin charnela) sólo está de acuerdo con el modelo S1. **(f)** Con menos moléculas de miosina unidas, las cuentas se desprenderían de manera temporal de la actina a medida que lo permitiese la miosina. Las cuentas se moverían entonces más lentamente, ya que se necesita tiempo para que se una una segunda molécula de miosina. A mayor densidad de miosina, a medida que se desprende una miosina se une otra rápidamente, lo que lleva a un movimiento más rápido. **(g)** Por encima de una cierta densidad, lo que limita la velocidad del movimiento es la velocidad intrínseca con la que las moléculas de miosina mueven las cuentas. Las moléculas de miosina se mueven a velocidad máxima por lo que la adición de más moléculas no aumenta la velocidad. **(h)** Debido a que la fuerza se produce en la cabeza S1, el daño en la cabeza S1 probablemente inactivaría la molécula resultante, con lo que SHMM no sería capaz de producir movimiento. **(i)** La cabeza S1 se ha de mantener junta mediante interacciones no covalentes que sean suficientemente fuertes para retener la forma activa de la molécula.

Capítulo 6

1. La actividad del enzima que convierte azúcar en almidón se destruye por desnaturalización térmica.

2. $2{,}4 \times 10^{-6}$ M

3. $9{,}5 \times 10^{8}$ años

4. El complejo enzima-sustrato es más estable que el enzima solo.

5. **(a)** 190 Å **(b)** El plegamiento tridimensional del enzima coloca estos residuos aminoácidos muy próximos.

6. La velocidad de reacción se puede medir siguiendo la disminución de absorbancia del NADH (a 340 nm) a medida que transcurre la reacción. Determine el valor de K_m; utilizando concentraciones de sustrato muy por encima de la K_m mida la velocidad inicial (velocidad de desaparición de NADH con el tiempo, medida espectrofotométricamente) a varias concentraciones conocidas de enzima y obtenga una gráfica de las velocidades iniciales frente a la concentración de enzima. La gráfica habría de ser lineal, con una pendiente que proporciona una medida de la concentración de LDH.

7. (b), (e), (g)

8. **(a)** $1{,}7 \times 10^{-3}$ M **(b)** 0,33; 0,67; 0,91 **(c)** La curva de la parte superior corresponde al enzima B ($[X] > K_m$ para este enzima); la curva inferior al enzima A.

9. **(a)** 400 s^{-1} **(b)** 10 μM **(c)** $\alpha = 2$, $\alpha' = 3$ **(d)** Inhibidor mixto

10. **(a)** 24 nM **(b)** 4 μM (V_0 es exactamente la mitad de V_{max}, por lo que $[A] = K_m$) **(c)** 40 μM (V_0 es exactamente la mitad de V_{max}, por lo que $[A] = 10$ veces K_m en presencia del inhibidor) **(d)** No, puesto que $k_{cat}/K_m = 0{,}33/(4 \times 10^{-6}\ M^{-1}s^{-1}) = 8{,}25 \times 10^{4}\ M^{-1}s^{-1}$, muy por debajo del límite controlado por difusión.

11. $V_{max} \approx 140$ μM/min; $K_m \approx 1 \times 10^{-5}$ M

12. **(a)** $V_{max} = 51{,}5$ mM /min, $K_m = 0{,}59$ mM
(b) Inhibición competitiva

13. $K_m = 2{,}2$ mM; $V_{max} = 0{,}50$ μmol/min

14. Curva A

15. $k_{cat} = 2{,}0 \times 10^{7}\ min^{-1}$

16. Los supuestos básicos de la ecuación de Michaelis-Menten aún son válidos. La reacción se encuentra en estado estacionario y la velocidad viene determinada por $V_0 = k_2$ [ES]. Las ecuaciones necesarias para obtener [ES] son:

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] \quad y \quad [EI] = \frac{[E][I]}{K_I}$$

El término [E] se puede obtener reordenando la Ecuación 6–19. El resto sigue el patrón establecido para la deducción de la ecuación de Michaelis-Menten en el texto.

17. Valor mínimo de M_r = 29.000

18. La actividad del enzima prostático es igual a la actividad fosfatasa total en una muestra de sangre menos la actividad fosfatasa en presencia de una cantidad suficiente de tartrato que inhiba completamente el enzima prostático.

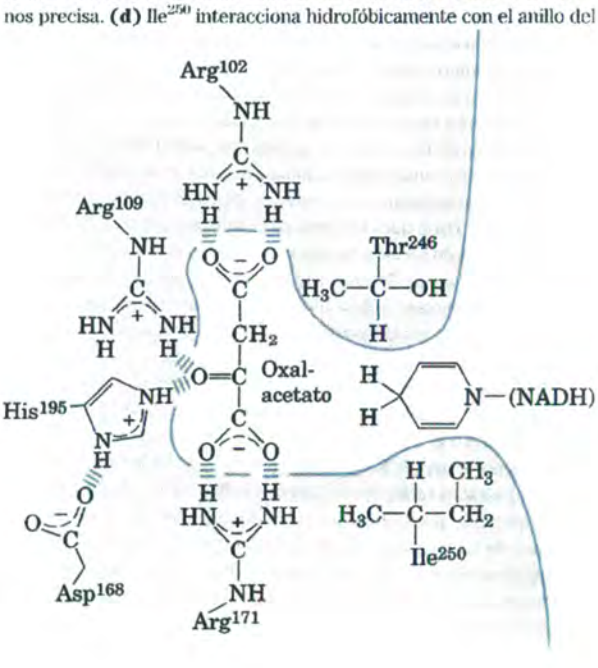
19. La inhibición es mixta. Dado que K_m no parece que cambie de modo apreciable, podría ser un caso especial denominado no competitiva.

20. La [S] a la que $V_0 = V_{max}/2\alpha'$ se obtiene cuando todos los términos excepto V_{max} del miembro de la derecha de la Ecuación 6–30, es decir $[S]/(\alpha K_m + \alpha'[S])$, son iguales a $\frac{1}{2}\alpha'$. Empiece con $[S]/(\alpha K_m + \alpha'[S]) = \frac{1}{2}\alpha'$ y despeje [S].

21. La actividad óptima tiene lugar cuando Glu^{35} está protonado y Asp^{52} desprotonado.

22. **(a)** Factor de incremento = 1,96; $V_0 = 50\ \mu M\ s^{-1}$; factor de incremento = 1,048.
(b) Cuando $\alpha = 2{,}0$, la curva se desplaza hacia la derecha mientras que la K_m aumenta en un factor de 2. Cuando $\alpha' = 3{,}0$, la asíntota de la curva (la V_{max}) disminuye en un factor de 3. Cuando $\alpha = 2{,}0$ y $\alpha' = 3{,}0$, la curva supera brevemente la curva a la que tanto α como $\alpha' = 1{,}0$, debido a la disminución de K_m. Sin embargo, la asíntota es menor, porque V_{max} disminuye en un factor de 3. **(c)** Cuando $\alpha = 2{,}0$, la intersección en x se desplaza hacia la derecha. Cuando $\alpha = 2{,}0$ y $\alpha' = 3{,}0$, la intersección en x se desplaza hacia la izquierda.

23. **(a)** En el enzima salvaje, el sustrato se mantiene en su sitio con un enlace de hidrógeno y una interacción ión-dipolo entre la cadena lateral cargada de Arg^{109} y el carbonilo polar del piruvato. Durante la catálisis, la cadena lateral cargada de Arg^{109} estabiliza el carbonilo polarizado del estado de transición. En el mutante la unión se reduce a sólo un enlace de hidrógeno, la unión del sustrato es más débil y se pierde la estabilización iónica del estado de transición con lo que se reduce la actividad catalítica. **(b)** Dado que Lys y Arg tienen casi el mismo tamaño y una carga positiva similar, probablemnte tengan propiedades parecidas. Además, debido a que el piruvato se une a Arg^{171} por (supuestamente) una interacción iónica, la mutación de Arg a Lys tendría poco efecto sobre la unión del sustrato. **(c)** El ordenamiento "tipo forca" alinea dos grupos cargados positivamente de residuos Arg con los oxígenos cargados negativamente del piruvato y facilitan dos interacciones combinadas de enlace de hidrógeno y dipolo-ión. Cuando se encuentra presente Lys, sólo una de estas combinaciones enlace de hidrógeno y dipolo-ión es posible, con lo que se reduce la fuerza de la interacción. La colocación del sustrato es menos precisa. **(d)** Ile^{250} interacciona hidrofóbicamente con el anillo del NADH. este tipo de interacción no es posible con la cadena lateral hidrofílica de la Gln. **(e)** La estructura se muestra abajo a la izquierda. **(f)** El enzima mutante rechaza el piruvato porque la hidrofobicidad del grupo metilo del piruvato no interacciona con el grupo guanidinio muy hidrofílico de Arg^{102}. El mutante une el oxalacetato gracias a la fuerte interacción iónica entre la cadena lateral de Arg^{102} y el carboxilo del oxalacetato. **(g)** La proteína ha de ser flexible para acomodar el volumen añadido de la cadena lateral y del sustrato más grande.



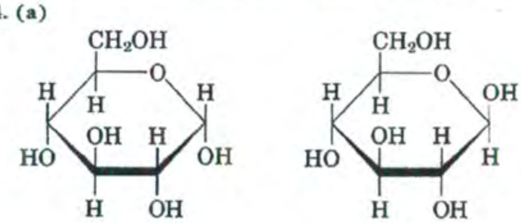
Capítulo 7

1. Con la reducción del oxígeno carbonílico a grupo hidroxilo, la química en C-1 y C-3 es la misma; la molécula de glicerol no es quiral.

2. Los epímeros difieren en la configuración alrededor de un *único* carbono. **(a)** D-altrosa (C-2), D-glucosa (C-3), D-gulosa (C-4). **(b)** D-idosa (C-2), D-galactosa (C-3), D-alosa (C-4) **(c)** D-arabinosa (C-2), D-xilosa (C-3)

3. La formación de osazonas destruye la configuración alrededor de C-2 de las aldosas, por lo que las aldosas que difieren sólo en la configuración en C-2 dan el mismo derivado, con el mismo punto de fusión.

4. **(a)**



α-D-Glucosa β-D-Glucosa

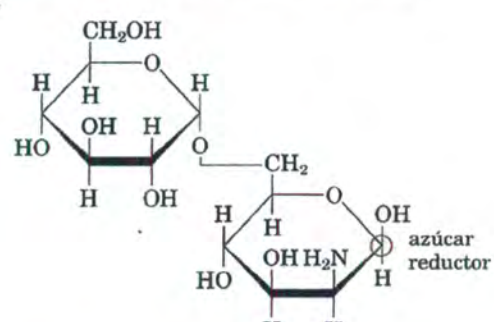
(b) Una solución reciente de α-D-glucosa, o de β-D-glucosa, experimenta una mutarrotación hasta una mezcla en equilibrio de las formas α y β. **(c)** 36 % de forma α; 64 % de forma β.

5. Para convertir la α-D-glucosa en β-D-glucosa, el enlace entre C-1 y el hidroxilo en C-5 (como en la Fig. 7–6). Para convertir D-glucosa en D-manosa, el —H o el —OH en C-2. La conversión entre conformaciones en silla no requiere rotura de enlace; ésta es la distinción crítica entre configuración y conformación.

6. No; glucosa y galactosa difieren en C-4.

7. **(a)** Los dos son polímeros de D-glucosa, pero difieren en el enlace glucosídico: (β1→4) para la celulosa, (α1→4) para el glucógeno. **(b)** Ambas son hexosas, pero la glucosa es una aldohexosa y la fructosa una cetohexosa. **(c)** Ambos son disacáridos, pero la maltosa tiene dos unidades de D-glucosa unidas en enlace (α1→4); la sacarosa tiene D-glucosa y D-fructosa unidas (α1→2β).

8.



9. Se forma un hemiacetal cuando se condensa una aldosa o una cetosa con un alcohol; se forma un glucósido cuando se condensa un hemiacetal con un alcohol (véase la Fig. 7–5, p. 238).

10. La fructosa se cicla a la estructura de piranosa o de furanosa. El aumento de la temperatura desplaza el equilibrio en dirección de la furanosa, que es la forma menos dulce.

11. Maltosa; la sacarosa no tiene grupo reductor (oxidable), ya que los carbonos anoméricos de ambos monosacáridos están implicados en el enlace glucosídico.

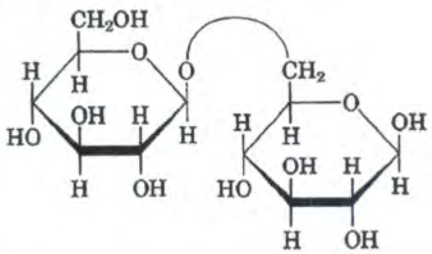
12. La velocidad de mutarrotación es lo suficientemente elevada para que a medida que el enzima consume β-D-glucosa, más α-D-glucosa se convierta en la forma β; finalmente, se oxida toda la glucosa. La glucosa oxidasa es específica para la glucosa y no detecta otros azúcares reductores (como la galactosa) que reaccionan con el reactivo de Fehling.

13. **(a)** Mida la variación de la rotación óptica con el tiempo. **(b)** La rotación óptica de la mezcla es negativa (invertida) con respecto a la solución de sacarosa. **(c)** −2,0°

14. Prepare una suspensión de sacarosa en agua para el relleno; añada una pequeña cantidad de sacarasa (invertasa); cúbralo inmediatamente con chocolate.

15. La sacarosa no tiene carbono anomérico libre para experimentar mutarrotación.

16.



Sí; sí

17. La *N*-acetil-β-D-glucosamina es un azúcar reductor; su C-1 se puede oxidar (véase la Fig. 7–10, p. 241). El D-gluconato no es un azúcar reductor; su C-1 ya está en el estado de oxidación de un ácido carboxílico. GlcN(α1↔1α)Glc no es un azúcar reductor; los carbonos anoméricos de ambos monosacáridos intervienen en el enlace glucosídico.

18. Los humanos carecen de celulasa en el intestino, por lo que no pueden degradar la celulosa.

19. La celulosa nativa consiste en unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos (β1→4) que obligan a la cadena polimérica a adoptar una conformación extendida. Series paralelas de estas cadenas extendidas forman puentes de hidrógeno intermoleculares que se agregan dando fibras insolubles largas y duras El glucógeno consta de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos (α1→4) que hacen curvar la cadena impidiendo la formación de fibras largas. Además, el glucógeno está altamente ramificado y, dado que muchos de sus grupos hidroxilo están expuestos al agua, está muy hidratado, con lo que se dispersa en el agua.

La celulosa es un material estructural de las plantas gracias a su agregación lateral en fibras insolubles. El glucógeno es un combustible de almacén en los animales. Los gránulos de glucógeno muy hidratados con sus muchos extremos no reductores son rápidamente hidrolizados por la glucógeno fosforilasa para liberar glucosa 1-fosfato.

20. La celulosa es varias veces más larga; adopta una conformación extendida, mientras que la amilosa tiene una estructura helicoidal.

21. 6.000 residuos/s

22. 11 s

23. El modelo de bolas y varillas del disacárido de la Fig. 7–19 no muestra interacciones estéricas, pero un modelo espacial, que muestra los átomos con sus tamaños relativos reales, mostraría varios obstáculos estéricos fuertes en el confórmero −170°, −170° que no están presentes en el confórmero 30°,−40°.

24. Las cargas negativas del condroitina sulfato se repelen entre sí y obligan a la molécula a adoptar una conformación extendida. La molécula polar atrae muchas moléculas de agua, incrementando así el volumen molecular. En el sólido deshidratado cada carga negativa está neutralizada por un ión positivo, con lo que la molécula se condensa.

25. Los residuos aminoácidos cargados positivamente se fijarían a los grupos de la heparina cargados muy negativamente. De hecho, residuos Lys de la antitrombina III interaccionan con la heparina.

26. 8 secuencias posibles, 144 enlace posibles y 64 posibilidades estereoquímicas para un total de ¡73.728 permutaciones!

27.

28. Oligosacáridos; sus subunidades se pueden combinar en más formas diferentes que las subunidades aminoácidas de los oligopéptidos. Cada grupo hidroxilo puede participar en enlaces glucosídicos y la configuración de cada enlace glucosídico puede ser α o β. El polímero puede ser lineal o ramificado.

29. **(a)** Los residuos en los puntos de ramificación producen 2,3-*O*-dimetilglucosa; los no ramificados dan 2,3,6-*O*-trimetilglucosa. **(b)** 3,75%

30. Cadenas de residuos de D-glucosa unidos (1→6) con ramas ocasionales unidas (1→3) con una rama aproximadamente cada 20 residuos.

31. **(a)** Las pruebas consisten en intentar disolver sólo parte de la muestra en diversos disolventes y analizar luego tanto los materiales disueltos como no disueltos para ver si difieren sus composiciones.
(b) Para un sustancia pura, todas las moléculas son iguales, por lo que cualquier fracción disuelta tendrá la misma composición que cualquier fracción no disuelta. Una sustancia impura es una mezcla de más de un compuesto. Cuando se trata con un determinado disolvente, se puede disolver más cantidad de un componente dejando más del otro componente sin disolver. El resultado es que las fracciones disuelta y no disuelta tienen composiciones diferentes. **(c)** Un ensayo cuantitativo permite estar seguro que no se ha perdido nada de actividad a causa de la degradación. Cuando se determina la estructura de una molécula es importante que la muestra analizada consista únicamente en moléculas intactas (no degradadas). Si la muestra está contaminada con material degradado se pueden obtener resultados estructurales confusos y quizá ininterpretables. Una prueba cualitativa detectaría la presencia de actividad, incluso si había existido una degradación significativa. **(d)** Resultados 1 y 2. El resultado 1 es consistente con la estructura conocida, porque el antígeno tipo B tiene tres moléculas de galactosa; los tipos A y O tienen sólo dos cada uno. El resultado 2 también es consistente, ya que el tipo A tiene dos aminoazúcares (*N*-acetilgalactosamina y *N*-acetilglucosamina). El resultado 3 *no* es consistente con la estructura conocida: para el tipo A la razón glucosamina:galactosamina es 1:1; para el tipo B es 1:0. **(e)** Las muestras serán probablemente impuras y/o parcialmente degradadas. Los dos primeros resultados eran correctos posiblemente porque el método sólo era aproximadamente cuantitativo, por lo que no era sensible a las imprecisiones de la medición. El tercer resultado es más cuantitativo y por tanto con más probabilidades de diferir de los valores previstos a causa de muestras impuras o degradadas. **(f)** Una exoglucosidasa. Si fuese una endoglucosidasa, uno de los productos de su acción sobre el antígeno O incluiría galactosa, *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina y al menos uno de estos azúcares podría inhibir la reacción. Dado que el enzima no es inhibido por ninguno de estos azúcares, ha de ser una exoglucosidasa, que sólo elimina el azúcar terminal de la cadena. El azúcar terminal del antígeno O es fucosa, por lo que esta es el único azúcar que podría inhibir la degradación del antígeno O. **(g)** La exoglucosidasa elimina *N*-acetilgalactosamina del antígeno A y galactosa del B. Dado que la fucosa no es un producto de ninguna de estas reacciones, no impedirá la eliminación de esos azúcares, con lo que las sustancias resultantes ya no serán activas como antígeno A o B. No obstante, los productos deberían ser activos como antígeno O, porque la degradación se detiene en la fucosa. **(h)** Todos los resultados están de acuerdo con la Fig. 10-15. (1) La D-fucosa y la L-galactosa, que protegerían contra la degradación, no están en ninguno de los antígenos. (2) El azúcar terminal del antígeno A es *N*-acetilgalactosamina y sólo este azúcar protege este antígeno de la degradación. (3) El azúcar terminal del antígeno B es galactosa que es el único capaz de proteger este antígeno.

Capítulo 8

1. N-3 y N-7

2. (5′)GCGCAATATTTTGAGAAATATTGCGC(3′); contiene un palíndromo. Las hebras individuales pueden formar estructuras en horquilla; las dos hebras pueden formar un cruciforme.

3. $9,4 \times 10^{-4}$ g

4. **(a)** 40° **(b)** 0°

5. La hélice de RNA está en la conformación A; la hélice de DNA está generalmente en la conformación B.

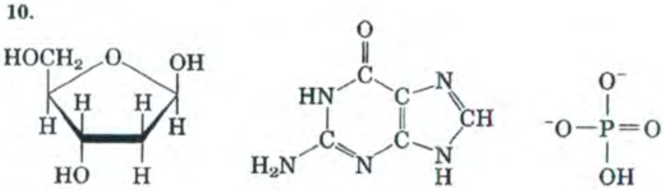
6. En el DNA de eucariotas, alrededor del 5% de los residuos C están metilados. La 5-metilcitosina puede desaminarse espontáneamente dando timina; el par G—T resultante es uno de los apareamientos incorrectos más comunes en las células eucarióticas.

7. Sin la base, el anillo de ribosa puede abrirse generando la forma aldehído no cíclica. Esto y la pérdida de interacciones de apilamiento de bases podría contribuir una flexibilidad significativa al armazón de DNA.

8. El apilamiento de bases en los ácidos nucleicos tiende a reducir la absorción de la luz UV. La desnaturalización implica la pérdida del apilamiento de bases con lo que aumenta la absorción al UV.

9. 0,35 mg/mL.

10.

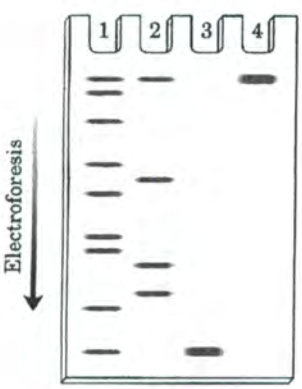


Desoxirribosa Guanina Fosfato

Solubilidades: fosfato > desoxirribosa > guanina. Los grupos fosfato altamente polares y las porciones de azúcar están en el exterior de la doble hélice expuestos al agua; las bases hidrofóbicas están en el interior de la hélice.

11. Al omitirse dCTP, cuando se encuentre el primer residuo G del molde, se incorporará ddCTP con lo que se detendrá la plimerización. Sólo se verá una banda en el gel de secuenciación.

12.



13. (5′)P—GCGCCAUUGC(3′)—OH
(5′)P—GCGCCAUUG(3′)—OH
(5′)P—GCGCCAUU(3′)—OH
(5′)P—GCGCCAU(3′)—OH
(5′)P—GCGCCA(3′)—OH
(5′)P—GCGCC(3′)—OH
(5′)P—GCGC(3′)—OH
(5′)P—GCG(3′)—OH
(5′)P—GC(3′)—OH
y los nucleósidos 5′-fosfato

14. **(a)** El agua participa en la mayor parte de reacciones biológicas incluidas las que producen mutaciones. El bajo contenido en agua de las endosporas reduce la actividad de los enzimas productores de mutaciones y enlentece la velocidad de reacciones de despurinización no enzimáticas, las cuales son reacciones de hidrólisis. **(b)** La luz UV induce la formación de dímeros ciclobutano de pirimidinas. Debido a que *B. subtilis* es un organismo del suelo, las esporas se pueden instalar en la parte superior del suelo o en el aire, en donde pueden estar sujetas a una exposición prolongada a la luz UV.

15. DMT es un grupo bloqueante que impide la reacción de la base entrante consigo misma.

16. **(a)** Dextrógira. La base en un extremo 5′ es adenina; en el otro extremo 5′, citidina. **(b)** Levógira. **(c)** Si no puede ver las estructuras en estéreo, vea indicaciones adicionales en el manual de soluciones ampliadas o utilice elementos de búsqueda para encontrar indicaciones online.

17. **(a)** ¡No sería fácil! Los datos para diferentes muestras del mismo organismo muestran una variación significativa además de que la recuperación nunca es del 100%. Las cifras para C y T muestran mucha más consistencia que las de A y G, por lo que para C y T es mucho más fácil demostrar que muestras del mismo organismo tienen la misma composición. Pero incluso con los valores menos consistentes para A y G, (1) la gama de valores para los diferentes tejidos se solapan sustancialmente; (2) la diferencia entre preparaciones diferentes del mismo tejido es la misma que la diferencia entre muestras de tejidos diferentes, y (3) en muestras con una alta recuperación las cifras son más consistentes. **(b)** Esta técnica no sería suficientemente sensible para detectar una diferencia entre células normales y células cancerosas. El cáncer está producido por mutaciones, pero estos cambios en el DNA, unos pocos pares de bases dentro de varios miles de millones, son demasiado pequeños para detectarlos con estas técnicas. **(c)** Las razones A:G y T:C varían ampliamente entre especies diferentes. Por ejemplo, en la bacteria *Serratia marcescens*, ambas razones son aproximadamente 0,4 lo que indica que el DNA contiene principalmnte G y C. En *Haemophilus influenzae*, por el contrario, las razones son 1,74 y 1,54 lo que indica que el DNA contiene mayoritariamente A y T. **(d)** La conclusión 4 tiene tres requisitos: A = T: la Tabla muestra una razón A:T muy próxima a 1 en todos los casos. Ciertamente, la variación en esta razón es sustancialmente menor que la variación en las razones A:G y T:C. G = C: Una vez más, la razón G:C es muy próxima a 1 mientras que las otras razones varían mucho. (A + G) = (T + C): Ésta es la razón purina:pirimidina, que es también muy próxima a 1. **(e)** Las diferentes fracciones "núcleo" representan regiones diferentes del DNA de germen de trigo. Si el DNA fuese una secuencia repetitiva monótona, la composición de bases sería la misma en todas las regiones. Dado que diferentes regiones núcleo tienen secuencias diferentes, la secuencia de DNA ha de ser más compleja.

Capítulo 9

1. **(a)** (5′) - - - G(3′) y (5′)AATTC - - - (3′)
(3′) - - - CTTAA(5′) (3′)G - - - (5′)
(b) (5′) - - - GAATT(3′) y (5′)AATTC - - - (3′)
(3′) - - - CTTAA(5′) (3′)TTAAG - - - (5′)
(c) (5′) - - - GAATTAATTC - - - (3′)
(3′) - - - CTTAATTAAG - - - (5′)
(d) (5′) - - - G(3′) y (5′)C - - - (3′)
(3′) - - - C(5′) (3′)G - - - (5′)
(e) (5′) - - - GAATTC - - - (3′)
(3′) - - - CTTAAG - - - (5′)
(f) (5′) - - - CAG(3′) y (5′)CTG - - - (3′)
(3′) - - - GTC(5′) (3′)GAC - - - (5′)
(g) (5′) - - - CAGAATTC - - - (3′)
(3′) - - - GTCTTAAG - - - (5′)
(h) Método 1: corte el DNA con *Eco*RI igual que en (a). En este punto se puede tratar el DNA como en (b) o en (d), se liga a continuación un fragmento de DNA sintético con la secuencia de reconocimiento de *Bam*HI entre los dos extremos romos resultantes. Método 2 (más eficiente): sintetice un fragmento de DNA con la estructura:

(5′)AATTGGATCC(3′)
(3′)CCTAGGTTAA(5′)

Éste se ligaría eficientemente a los extremos cohesivos generados por el corte con *Eco*RI, introduciría un sitio *Bam*HI, pero no regeneraría el sitio *Eco*RI. **(i)** Los cuatro fragmentos (con N = cualquier nucleótido), en orden de discusión en el problema son:

(5′)AATTCNNNNCTGCA(3′)
(3′)GNNNNG(5′)
(5′)AATTCNNNNGTGCA(3′)
(3′)GNNNNC(5′)
(5′)AATTGNNNNCTGCA(3′)
(3′)CNNNNG(5′)
(5′)AATTGNNNNGTGCA(3′)
(3′)CNNNNC(5′)

2. El DNA del fago λ se puede empaquetar en partículas de fago infecciosas sólo si tiene una longitud entre 40.000 y 53.000 pares de bases. Dado que los vectores bacteriófagos tienen unos 30.000 pares de bases (en dos piezas) no se empaquetarán en las partículas de fago a menos que contengan una longitud suficiente de DNA insertado (10.000 a 23.000 pares de bases).

3. **(a)** Plásmidos en los que el pBR322 original se regeneró sin inserción de un fragmento de DNA foráneo; éstos retendrían la resistencia a la ampicilina. Además, dos o más moléculas de pBR322 podrían ligarse entre sí con o sin inserción de DNA foráneo. **(b)** Cada uno de los clones en los carriles 1 y 2 tienen un fragmento de DNA insertado con orientaciones diferentes. El clon del carril 3 tiene dos fragmentos de DNA ligados de tal manera que se unen los extremos *Eco*RI próximos.

4. Foco en los aminoácidos con menos codones: Met y Trp. La mejor posibilidad es la distancia de DNA desde el codón del primer residuo Trp a los dos primeros nucleótidos del codón de Ile. La sonda sería:

(5′)UGGUA(U/C)UG(U/C)AUGGA(U/C)UGGAU

La síntesis estaría diseñada para incorporar U o C en donde se ha indicado, produciendo una mezcla de ocho sondas de 20 nucleótidos que sólo difieren en una o más de estas posiciones.

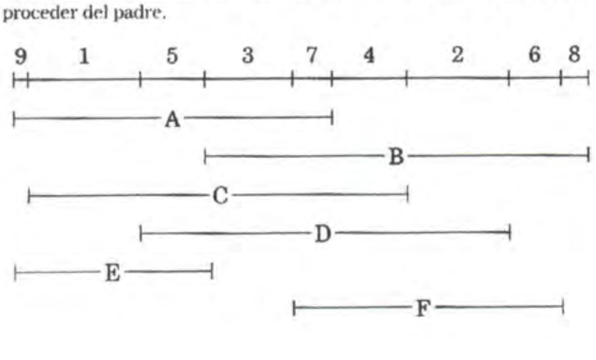
5. Su prueba requeriría cebadores de DNA, una DNA polimerasa termostable, desoxinucleósidos trifosfato y una máquina de PCR. Los cebadores se diseñarían para simplificar un segmento de DNA que abarca la repetición CAG. La hebra de DNA mostrada es la hebra codificante, orientada 5′ → 3′ de izquierda a derecha. El cebador dirigido hacia el DNA de la izquierda de la repetición sería idéntico a cualquier secuencia de 25 nucleótidos mostrada en la región a la izquierda de la repetición CAG. El cebador del lado derecho ha de ser *complementario* y *antiparalelo* a una secuencia de 25 nucleótidos a la derecha de la repetición CAG. Usando los cebadores se amplificaría el DNA que incluye la repetición CAG por PCR y se determinaría su tamaño por comparación con marcadores de tamaño tras electroforesis. La longitud del DNA reflejaría la longitud de la repetición CAG, proporcionando una prueba sencilla para la enfermedad.

6. Diseñe cebadores para la PCR complementarios al DNA en el segmento eliminado pero que dirigirían la síntesis del DNA lejos de cada uno. No se generaría ningún producto de la PCR a menos que se unan los extremos del segmento eliminado para crear un círculo.

7. La planta que expresa la luciferasa de luciérnaga ha de captar luciferina, el sustrato de la luciferasa, antes de que pueda "resplandecer" (si bien débilmente). La planta que expresa la proteína fluorescente verde resplandece sin requerir ningún otro compuesto.

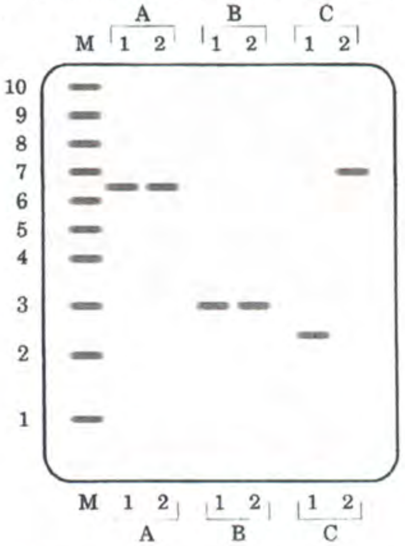
8. No se puede excluir ningún niño. Todos tienen una banda que podría proceder del padre.

9.



10. Simplemente por conveniencia; el plásmido Ti de 200.000 pb, aun cuando se haya eliminado el DNA T, es demasiado grande para aislarlo en cantidad y manipularlo in vitro. También es demasiado grande para reintroducirlo en una célula con las técnicas estándar de transformación. Los genes *vir* facilitarán la transferencia de cualquier DNA entre las repeticiones del DNA T, incluso si están en plásmidos separados. Dado que el segundo plásmido en el sistema de dos plásmidos sólo requiere las repeticiones del DNA T y unas pocas secuencias necesarias para la selección y propagación de plásmidos, es relativamente pequeño y se aísla y se manipula fácilmente (DNA foráneo fácilmente adicionado y/o alterado).

11.



12. Cubra la mancha 4, añada solución con T activada, irradie y lave.

1. A–T 2. G–T 3. A–T 4. G–C

Cubra las manchas 2 y 4, añada solución con G activada, irradie, lave

1. A–T–G 2. G–T 3. A–T–G 4. G–C

Cubra la mancha 3, añada solución con C activada, irradie, lave

1. A–T–G–C 2. G–T–C 3. A–T–G 4. G–C–C

Cubra las manchas 1, 3 y 4, añada solución con C activada, irradie, lave

1. A–T–G–C 2. G–T–C–C 3. A–T–G 4. G–C–C

Cubra las manchas 1 y 2, añada solución con G activada, irradie, lave.

1. A–T–G–C 2. G–T–C–C 3. A–T–G–C 4. G–C–C–C

13. Los vectores se tienen que introducir en una célula infectada con un virus colaborador que puede proporcionar las necesarias funciones de replicación y empaquetamiento pero que no puede empaquetarse por sí mismo. Una vez que el DNA recombinante se ha integrado en el cromosoma de la célula diana mediante estos vectores, la carencia de las funciones de recombinación y empaquetamiento hace que la integración sea muy estable al impedir la deleción o replicación del DNA integrado.

14. **(a)** Las soluciones de DNA son muy viscosas porque las moléculas que son muy largas están enredadas en solución. Las moléculas más cortas tienden a enredarse menos por lo que forman una solución menos viscosa; la viscosidad menor corresponde al acortamiento de los polímeros, como el que produce la actividad de la nucleasa. **(b)** Una endonucleasa. Una exonucleasa elimina nucleótidos individuales desde el extremo 5′ o el 3′ y daría lugar a nucleótidos marcados con ^{32}P solubles en TCA. Una endonucleasa corta el DNA dando fragmentos oligonucleotídicos y produce poco, o nada, material marcado con ^{32}P insoluble en TCA. **(c)** El extremo 5′. Si quedase el fosfato en el extremo 3′, la quinasa incorporaría una cantidad

significativa de ^{32}P en el extremo 5′; tratamiento con la fosfatasa no tendría efecto sobre esto. En este caso, las muestras A y B incorporarían cantidades significativas de ^{32}P. Cuando el fosfato está en el extremo 5′, la quinasa no incorpora ningún ^{32}P: no puede añadir un fosfato si ya hay uno presente. El tratamiento con la fosfatasa elimina el fosfato en 5′ y la quinasa adiciona entonces cantidades significativas de ^{32}P. La muestra A tendrá poco, o nada, ^{32}P y la B mostrará incorporación sustancial de ^{32}P, tal como se observó. **(d)** Roturas al azar producirían una distribución de fragmentos de tamaño estadístico. La producción de fragmentos específicos indica que el enzima tiene especificidad de sitio. **(e)** Rotura en el sitio de reconocimiento. Esto produce una secuencia específica en el extremo 5′ de los fragmentos. Si la rotura hubiese tenido lugar cerca, pero no dentro del sitio de reconocimiento, la secuencia en el extremo 5′ de los fragmentos sería al azar. **(f)** Los resultados son consistentes con dos secuencias de reconocimiento, tal como se muestra a continuación, cortadas en los puntos indicados por las flechas:

↓
(5′) – – – GTT AAC – – – (3′)
(3′) – – – CAA TTG – – – (5′)
↑

que da los fragmentos (5′)pApApC y (3′)TpTp, y

↓
(5′) – – – GTC GAC – – – (5′)
(3′) – – – CAG CTG – – – (5′)
↑

que da los fragmentos (5′)pGpApC y (3′)CpTp.

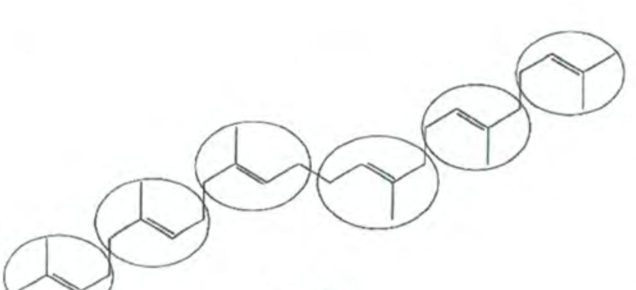
Capítulo 10

1. El término "lípido" no especifica una estructura química particular. Los compuestos se categorizan como lípidos en base a su mayor solubilidad en disolventes orgánicos que en agua.
2. **(a)** El número de dobles enlaces *cis*. Cada doble enlace en *cis* produce una curvatura en la cadena hidrocarbonada, disminuyendo la temperatura de fusión. **(b)** Se pueden construir seis triacilgliceroles diferentes según el orden de sus puntos de fusión:

$$OOO < OOP = OPO < PPO = POP < PPP$$

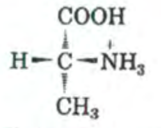
en donde O = ácido oleico y P = ácido palmítico. Cuanto mayor es el contenido de ácido graso saturado mayor es el punto de fusión. **(c)** Los ácidos grasos de cadena ramificada aumentan la fluidez de las membranas porque disminuyen el grado de empaquetamiento de lípidos de la membrana.

3. La lecitina, un compuesto anfipático, es un agente emulgente que facilita la solubilización de la mantequilla.
4.

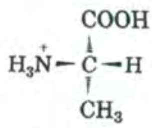


Escualeno

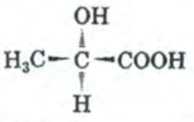
5. La hierbabuena es (*R*)-carvona; la alcaravea es (*S*)-carvona.
6.



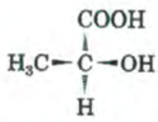
Ácido (*R*)-2-aminopropanoico



Ácido (*S*)-2-aminopropanoico

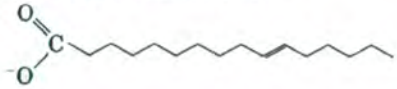


Ácido (*R*)-2-hidroxipropanoico



Ácido (*S*)-2-hidroxipropanoico

7. *Unidades hidrófobicas:* **(a)** 2 ácidos grasos; **(b)**, **(c)** y **(d)** 1 ácido graso y la cadena hidrocarbonada de la esfingosina; **(e)** el núcleo esteroide y la cadena acíclica lateral. *Unidades hidrofílicas:* **(a)** fosfoetanolamina; **(b)** fosfocolina; **(c)** D-galactosa; **(d)** varias moléculas de azúcar; **(e)** grupo alcohol (OH)
8.



9. Reduce dobles enlaces lo que incrementa el punto de fusión de los lípidos que contienen los ácidos grasos.
10. Los triacilgliceroles de las grasas animales (sebo) son hidrolizados por el NaOH (saponificados) formando jabones, que son mucho más solubles en agua que los triacilgliceroles.
11. Sólo puede ser un esfingolípido (esfingomielina).
12.

Fosfatidilserina

13. Las cadenas acilo saturadas largas, casi sólidas a la temperatura del aire, forman una capa hidrofóbica en la que un compuesto polar tal como el H_2O no puede disolverse ni difundir.
14. **(a)** El grupo —OH libre del C-2 y el grupo de cabeza fosfocolina del C-3 son hidrofílicos; el ácido graso en el C-1 de la lisolecitina es hidrofóbico. **(b)** Ciertos esteroides tales como la prednisona inhiben la acción de la fosfolipasa A_2 inhibiendo la liberación de ácido araquidónico del C-2. El ácido araquidónico se convierte en distintos icosanoides, algunos de los cuales producen inflamación y dolor. **(c)** La fosfolipasa A_2 libera ácido araquidónico, un precursor de otros icosanoides con funciones protectoras vitales para el cuerpo; también degrada glicerofosfolípidos de la dieta.
15. La parte del lípido de membrana que determina el tipo sanguíneo es el oligosacárido en el grupo de cabeza de los esfingolípidos de la membrana (véase la Fig. 10–15, p.355). Este mismo oligosacárido está unido a ciertas glucoproteínas de la membrana que también sirven como puntos de reconocimiento de los anticuerpos que distinguen los grupos sanguíneos.
16. El diacilglicerol es hidrofóbico y permanece en la membrana. El inositol 1,4,5-trisfosfato es muy polar, muy soluble en agua y más fácilmente difundible en el citosol. Ambos son segundos mensajeros.
17. Las vitaminas hidrosolubles se excretan más rápidamente por la orina y no se almacenan de modo efectivo. Las vitaminas liposolubles tienen una solubilidad muy baja en agua y se almacenan como lípidos.
18. **(a)** El glicerol y las sales sódicas de los ácidos palmítico y esteárico. **(b)** D-Glicerol 3-fosfocolina y las sales sódicas de los ácidos palmítico y oleico.

19. Solubilidades en agua: monoacilglicerol > diacilglicerol > triacilglicerol.

20. Primero a último eluido: palmitato de colesterilo y triacilglicerol; colesterol y *n*-tetradecanol; fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina; esfingomielina; fosfatidilserina y palmitato.

21. **(a)** Someta el hidrolizado ácido de cada compuesto a cromatografía (GLC o TLC sobre gel de sílice) y compare el resultado con patrones conocidos. *Hidrolizado de esfingomielina*: esfingosina, ácidos grasos, fosfocolina, colina y fosfato; *hidrolizado de cerébrosido*: esfingosina, ácidos grasos, azúcares pero no fosfato. **(b)** La hidrólisis alcalina fuerte de la esfingomielina da esfingosina; la fosfatidilcolina da glicerol. Detecte los componentes del hidrolizado en los cromatogramas en capa fina por comparación con patrones o por su reacción diferencial con FDNB (sólo la esfingosina reacciona formando un producto coloreado). El tratamiento con la fosfolipasa A_1 o A_2 libera ácidos grasos libres de la fosfatidilcolina, pero no de la esfingomielina.

22. Fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.

23. **(a)** GM1 y globósido.Tanto la gluosa como la galactosa son hexosas, por lo que "hexosa" en la razón molar se refiere a glucosa + galactosa. Las razones de los cuatro gangliósidos son: GM1, 1:3:1:1; GM2, 1:2:1:1; GM3, 1:2:0:1, globósido: 1:3:1:0. **(b)** Sí. La razón concuerda con la de GM2, gangliósido que se espera que se acumule en la enfermedad de Tay-Sachs (véase el Recuadro 10–2, Fig. 1). **(c)** Este análisis es similar al utilizado por Sanger para determinar la secuencia de aminoácidos de la insulina. El análisis de cada fragmento sólo revela su *composición*, no su *secuencia*, pero dado que cada fragmento está formado por la eliminación secuencial de un azúcar, podemos sacar conclusiones sobre su secuencia. La estructura del asialogangliósido normal es ceramida–glucosa–galactosa–galactosamina–galactosa, de acuerdo con el Recuadro 10–2 (se excluye Neu5Ac que se eliminó antes de la hidrólisis). **(d)** El asialogangliósido de Tay-Sachs es ceramida–glucosa–galactosa–galactosamina, según el Recuadro 10-2. **(e)** La estrucura del asialogangliósido normal, GM1, es: *ceramida-glucosa* (2 —OH implicados en enlaces glucosídicos; 1 —OH implicado en la estructura del anillo; 3 —OH (2,3,6) libres para metilación)–*galactosa* (2 —OH en enlaces; 1 —OH en el anillo; 3 —OH (2,4,6) libres para metilación)–*galactosamina* (2 —OH en enlaces; 1 —OH en el anillo;1 —NH_2 en lugar de un —OH; 2 —OH (4,6) libres para metilación)–*galactosa* (1 —OH en enlace; 1 —OH en el anillo; 4 —OH (2,3,4,6) libres para metilación). **(f)** Faltan dos piezas de información claves: ¿Cuáles son las uniones entre los azúcares? ¿Donde se une el Neu5Ac?

Capítulo 11

1. De la cantidad conocida de lípido utilizado, su masa molecular y el área ocupada por una monocapa (determinada tal como se muestra), puede calcularse el área por molécula.

2. Los datos están de acuerdo con una bicapa lipídica en los eritrocitos de perro. Una célula con un área superficial de 98 μm^2 tiene un área de la monocapa lipídica total de 200 μm^2. En el caso de los eritrocitos ovinos y humanos, los datos sugieren la existencia de una monocapa, no una bicapa. De hecho, se produjeron errores experimentales significativos en estos primeros experimentos; medidas recientes más precisas están de acuerdo con una bicapa en todos los casos.

3. 63 moléculas de SDS por micela.

4. **(a)** Los lípidos que forman bicapas son moléculas anfipáticas: contienen una región hidrofílica y una hidrofóbica. Para minimizar el área hidrofóbica expuesta a la superficie acuosa, estos lípidos forman láminas bidimensionales con las regiones hidrofílicas expuestas al agua y las regiones hidrofóbicas sepultadas en el interior de la lámina. Además, para evitar la exposición de los extremos de la lámina al agua, las bicapas lipídicas se cierran sobre sí mismas. **(b)** Estas láminas forman las superficies cerradas de las membranas que envuelven las células y los compartimientos en el interior de las células (orgánulos).

5. 2 nm. Dos palmitatos situados cola a cola abarcarían unos 4 nm, aproximadamente el grosor de una bicapa típica.

6. Una disminución. El movimiento de lípidos individuales en las bicapas, es mucho más rápido a 37 °C, cuando los lípidos están en la fase "fluida", que a 10 °C cuando están en la fase "sólida".

7. 35 kJ/mol, despreciando los efectos del potencial eléctrico transmembrana; 0,60 mol

8. 13 kJ/mol

9. La mayor parte del O_2 consumido por un tejido es para la fosforilación oxidativa, fuente de la mayor parte del ATP. Por tanto, unas dos terceras partes del ATP sintetizado por el riñón se usan para bombear K^+ y Na^+.

10. No. El cotransportador paralelo puede transportar más de un equivalente de Na^+ por cada mol de glucosa transportada.

11. La extracción con sal indica una localización periférica y la inaccesibilidad a la proteasa en las células intactas una localización interna. X parece ser una proteína periférica en el lado citosólico de la membrana.

12. Las interacciones hidrofóbicas entre los lípidos de membrana son no covalentes y reversibles, lo que permite que las membranas se resellen espontáneamente.

13. La temperatura de los tejidos corporales en las extremidades es generalmente menor que la de los tejidos más próximos al centro del cuerpo. Si el lípido ha de permanecer fluido a esta menor temperatura ha de contener una mayor proporción de ácidos grasos insaturados; estos últimos disminuyen el punto de fusión de las mezclas de lípidos.

14. El coste energético de desplazar el grupo de cabeza altamente polar y, a veces, cargado a través del interior hidrofóbico de la bicapa es prohibitivo.

15. A pH 7 el triptófano es portador de una carga positiva y otra negativa, pero el indol no tiene carga. El desplazamiento del indol que es menos polar a través del núcleo hidrofóbico de la bicapa es energéticamente más favorable.

16. 3×10^{-2} s

17. Trate una suspensión de células con NEM sin marcar en presencia de un exceso de lactosa, elimine la lactosa y añada seguidamente NEM marcado radiactivamente. Utilice SDS-PAGE para determinar la M_r de la banda radiactiva (el transportador).

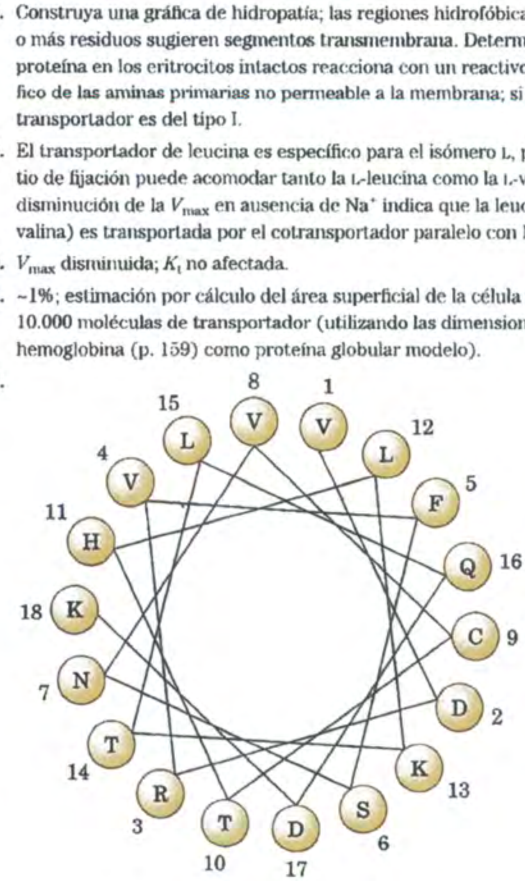
18. Construya una gráfica de hidropatía; las regiones hidrofóbicas de 20 o más residuos sugieren segmentos transmembrana. Determine si la proteína en los eritrocitos intactos reacciona con un reactivo específico de las aminas primarias no permeable a la membrana; si es así el transportador es del tipo I.

19. El transportador de leucina es específico para el isómero L, pero el sitio de fijación puede acomodar tanto la L-leucina como la L-valina. La disminución de la V_{max} en ausencia de Na^+ indica que la leucina (o la valina) es transportada por el cotransportador paralelo con Na^+.

20. V_{max} disminuida; K_t no afectada.

21. ~1%; estimación por cálculo del área superficial de la célula y de 10.000 moléculas de transportador (utilizando las dimensiones de la hemoglobina (p. 159) como proteína globular modelo).

22.



Los aminoácidos con el índice hidropático más elevado (V, L, F y C) están agrupados a un lado de la hélice. Esta hélice anfipática es probable que penetre en la bicapa lipídica a lo largo de su superficie hidrofóbica, al tiempo que expone la otra superficie a la fase acuosa. De modo alternativo, un grupo de hélices puede agruparse con sus superficies polares en contacto entre ellas y sus superficies hidrofóbicas encaradas hacia la bicapa lipídica.

23. ~ 22. Para calcular la fracción de la superficie de membrana cubierta por fosfolípidos, debería conocer (o calcular) el área de la superficie transversal de una molécula de fosfolípido en una bicapa (a partir de un experimento tal como el esbozado en el problema 1 de este capítulo) y el área transversal promedio de una proteína de 50 kDa.

24. **(a)** El desplazamiento por residuo de una hélice α (capítulo 4) es de unos 1,5 Å = 0,15 nm. Para abarcar una bicapa de 4 nm, una hélice α ha de contener unos 27 residuos; así, para siete pasos de la membrana se requieren unos 190 residuos. Una proteína de M_r 64.000 tiene unos 580 residuos. **(b)** Para localizar las regiones transmembrana se utiliza una gráfica hidropática. **(c)** Debido a que cerca de la mitad de esta porción del receptor de adrenalina consiste en residuos cargados, es probable que represente un bucle intracelular que conecta dos regiones adyacentes de la proteína que abarcan la membrana. **(d)** Dado que esta hélice está compuesta mayoritariamente por residuos hidrofóbicos es probable que esta porción del receptor sea una de las regiones de la proteína que atraviesan la membrana.

25. **(a)** *Modelo A:* a favor. Las dos líneas oscuras son las capas de proteína o las cabezas de los fosfolípidos y el espacio claro es la bicapa o el núcleo hidrofóbico, respectivamente. *Modelo B:* en contra. Este modelo requiere una banda tejida de modo más o menos uniforme alrededor de la célula. *Modelo C:* a favor, con una reserva. Las dos líneas oscuras son cabezas de fosfolípidos; la zona clara son las colas. Supone que las proteínas de la membrana no son visibles dado que no se tiñen con osmio o no se encuentran en las secciones visionadas. **(b)** *Modelo A:* a favor. Una bicapa "desnuda" (4,5 nm) + dos capas de proteína (2 nm) suma 6,5 nm, que está dentro de la gama de espesores observados. *Modelo B:* ninguno. Este modelo no permite predicciones sobre el espesor de la membrana. *Modelo C:* no está claro. El resultado es difícil de reconciliar con este modelo, que predice una membrana de tanto espesor, o algo más ancha (debido a los extremos que sobresalen de las proteínas incrustadas) que una bicapa "desnuda". El modelo es válido sólo si se corrigen los valores más pequeños de espesor de la membrana o si una cantidad sustancial de la proteína sobresale de la bicapa. **(c)** *Modelo A:* no está claro. El resultado es difícil de reconciliar con este modelo. Si las proteínas están unidas a la membrana mediante interacciones iónicas, el modelo predice que las proteínas contienen una proporción elevada de aminoácidos cargados, a diferencia de lo observado. Además, dado que la capa proteica ha de ser muy delgada (véase (b)), no habría demasiado espacio para un núcleo proteico hidrofóbico, por lo que los residuos hidrofóbicos estarían expuestos al disolvente. *Modelo B:* a favor. Las proteínas tienen una mezcla de residuos hidrofóbicos (que interaccionan con los lípidos) y residuos cargados (que interaccionan con el agua). *Modelo C:* a favor. Las proteínas tienen una mezcla de residuos hidrofóbicos (anclados en la membrana) y residuos cargados (que interaccionan con el agua). **(d)** *Modelo A:* no está claro. Es difícil reconciliar el resultado con este modelo, que predice una razón de exactamente 2,0; sería difícil de conseguir a presiones fisiológicamente aceptables. *Modelo B:* ninguno. Este modelo no hace predicciones sobre la cantidad de lípido en la membrana. *Modelo C:* a favor. Parte de la superficie de la membrana está ocupada por proteínas por lo que la razón sería inferior a 2,0 tal como se observó en condiciones fisiológicamente más pertinentes. **(e)** *Modelo A:* no está claro. El modelo predice proteínas en conformaciones extendidas más que globulares, por lo que sólo está de acuerdo si se supone que las proteínas situadas sobre la superficie incluyen segmentos helicoidales. *Modelo B:* a favor. El modelo predice que una mayoría de proteínas son globulares (aunque con algunos segmentos helicoidales). *Modelo C:* a favor. El modelo predice una mayoría de proteínas globulares. **(f)** *Modelo A:* no está claro. Los grupos de cabeza fosforilamina están protegidos por la capa de proteína, pero sólo si las proteínas cubren totalmente la superficie los fosfolípidos están totalmente protegidos de la fosfolipasa. *Modelo B:* a favor. La mayoría de grupos de cabeza son asequibles a la fosfolipasa. *Modelo C:* a favor. Todos los grupos de cabeza son asequibles a la fosfolipasa. **(g)** *Modelo A:* en contra. Las proteínas son enteramente accesibles a la digestión por tripsina, por lo que todas experimentarán múltiples cortes sin segmentos hidrofóbicos protegidos. *Modelo B:* en contra. Virtualmente todas las proteínas están en la bicapa y son inaccesibles a la tripsina. *Modelo C:* a favor. Los segmentos de proteína que penetran o abarcan la bicapa están protegidos de la tripsina; los que están expuestos a la superficie serán cortados. Las porciones resistentes a la tripsina tienen una proporción elevada de residuos hidrofóbicos.

Capítulo 12

1. X es cAMP; su producción es estimulada por la adrenalina.
(a) La centrifugación sedimenta la adenilil ciclasa (que cataliza la formación de cAMP) en la fracción particulada. **(b)** El cAMP añadido estimula la glucógeno fosforilasa. **(c)** El cAMP es termoestable; puede prepararse tratando el ATP con hidróxido bárico.

2. A diferencia del cAMP, el dibutiril-cAMP pasa fácilmente a través de la membrana plasmática.

3. **(a)** Aumenta [cAMP]. **(b)** El cAMP regula la permeabilidad al Na^+. **(c)** Reemplaza los fluidos corporales y los electrolitos perdidos.

4. **(a)** La mutación hace que R sea incapaz de unirse a la subunidad C inhibiéndola, por lo que C es constantemente activa. **(b)** La mutación impide la unión del cAMP a R, dejando C inhibida por la R unida.

5. El albuterol aumenta la [cAMP], lo que comporta la relajación y ensanchamiento de los bronquios y bronquiolos. Dado que los receptores β-adrenérgicos controlan otros muchos procesos, este fármaco tendría efectos secundarios indeseables. Para minimizarlos, encuentre un agonista específico para el subtipo de receptores β-adrenérgicos presentes en la musculatura lisa de los bronquios.

6. Degradación de la hormona; hidrólisis del GTP unido a una proteína G; degradación, metabolismo o secuestro del segundo mensajero; desensibilización del receptor; eliminación del receptor de la superficie celular.

7. Fusione CFP a la β-arrestina e YFP al dominio citoplasmático del receptor β-adrenérgico o viceversa. Ilumine a 433 nm y observe a 476 y a 527 nm. Si hay interacción, la intensidad de la luz emitida disminuirá a 476 nm y aumentará a 527 nm al añadir adrenalina a células que expresan las proteínas de fusión. Si no hay interacción, la longitud de onda de la luz emitida continuará siendo 476 nm. Hay varios motivos por los que podría fallar: las proteínas de fusión (1) son inactivas o incapaces de interaccionar, (2) no se translocan a su localización subcelular normal o (3) no son estables a la degradación proteolítica.

8. La vasopresina actúa elevando la $[Ca^{2+}]$ citosólica a 10^{-6} M, activando la proteína quinasa C. La inyeccion de EGTA bloquea la acción de la vasopresina, pero no debería afectar la respuesta al glucagón, el cual utiliza cAMP, *no* Ca^{2+} como segundo mensajero.

9. La amplificación es el resultado de una molécula de catalizador que activa muchas moléculas de otro catalizador en una cascada de amplificación en la que intervienen, en este orden, el receptor de insulina, IRS-1, Raf, MEK, ERK; ERK activa un factor de transcripción que estimula la producción de mRNA.

10. Una mutación en *ras* que inactive la actividad GTPasa de Ras crea una proteína que, una vez activada por la unión de GTP, continúa dando, vía Raf, la señal de respuesta a la insulina.

11. *Propiedades compartidas de Ras y G_s:* ambas pueden unir GDP o GTP; ambas son activadas por GTP; en forma activa, ambas activan un enzima posterior de la ruta; ambas tienen actividad GTPasa intrínseca que las desconecta tras un corto período de activación. *Diferencias entre Ras y G_s:* Ras es una proteína monomérica pequeña; G_s es heterotrimérica. *Diferencias funcionales entre G_s y G_i:* G_s activa la adenilil ciclasa, G_i la inhibe.

12. *Quinasa (factor entre paréntesis):* PKA (cAMP); PKG (cGMP); PKC (Ca^{2+}, DAG); Ca^{2+}/CaM quinasa (Ca^{2+}, CaM); quinasa dependiente de ciclina (ciclina); proteína Tyr quinasa (ligando para el receptor, por ejemplo insulina); MAPK (Raf); Raf (Ras); glucógeno fosforilasa quinasa (PKA).

13. G_s permanece en su forma activada una vez ha unido un análogo no hidrolizable. El análogo prolonga, por tanto, el efecto de la adrenalina sobre la célula inyectada.

14. **(a)** Utilice las cuentas unidas a α-bungarotoxina para la purificación por afinidad (véase la Fig. 3–17c, p. 87) del AChR. Extraiga proteínas de los órganos eléctricos y pase la mezcla a través de la columna de cromatografía; el AChR se une selectivamente a las cuentas. Eluya el AChR con un soluto que debilita la unión con la α-bungarotoxina. **(b)** Use la unión de la $[^{125}I]$α-bungarotoxina como *ensayo cuantitativo* para el AChR durante la purificación mediante diversas técnicas. En cada paso determine el AChR midiendo la unión de $[^{125}I]$α-bungarotoxina a las proteínas de la muestra. Optimice la purificación para obtener la actividad más elevada de AChR (cuentas/minuto de $[^{125}I]$α-bungarotoxina por mg de proteína) en el material final.

15. **(a)** No. Si V_m estuviese determinada por la permeabilidad (principalmente) al K^+ la ecuación de Nernst predeciría un V_m de –90 mV no el observado de –95 mV, por lo que ha de haber otra conductancia que también contribuya a V_m. **(b)** El ión cloruro es probablemente el determinante de V_m; el E_{Cl^-} previsto es –94 mV.

16. **(a)** El V_m de la membrana del oocito va de –60 mV a –10 mV, esto es, la membrana está despolarizada. **(b)** El efecto del KCl depende de un influjo de Ca^{2+} del medio extracelular.

17. La hiperpolarización de los bastones da lugar al cierre de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la región presináptica. La disminución resultante en la $[Ca^{2+}]$ disminuye la liberación de un neurotransmisor inhibidor que suprime la actividad en la neurona siguiente del circuito visual. Cuando se elimina esta inhibición en respuesta a un estímulo luminoso, el circuito se vuelve activo y se excitan los centros visuales del cerebro.

18. **(a)** Esto impediría la entrada de Na^+ y Ca^{2+} a las células en respuesta a la luz; los conos serían incapaces de señalar al cerebro que han recibido luz. Dado que los bastones no están afectados, los individuos podrían ver pero no tendrían visión de color. **(b)** Esto impediría la salida de K^+, lo que llevaría a la despolarización de la membrana de la célula β y a la liberación constitutiva de insulina a la sangre. **(c)** El ATP es el responsable de cerrar el canal, por lo que los canales permanecen abiertos, impidiendo la despolarización de la membrana de la célula β y la liberación de insulina.

19. Los individuos con la enfermedad de Oguchi podrían tener un defecto en la rodopsina quinasa o en la arrestina.

20. Los bastones ya no muestran ningún cambio en el potencial de membrana en respuesta a la luz. Este experimento ya se ha realizado. La iluminación activó la PDE, pero el enzima no redujo de manera significativa la concentración de 8-Br-cGMP, que permaneció muy por encima de la necesaria para mantener los canales controlados por voltaje abiertos. Así, la luz no tuvo impacto en el potencial de membrana.

21. **(a)** Al exponerlos al calor se abren los canales TRPV1 provocando la entrada de Na^+ y Ca^{2+} al interior de la neurona sensorial. Esto despolariza la neurona y desencadena un potencial de acción. Cuando el potencial de acción alcanza el extremo del axón se libera el neurotransmisor señalando al sistema nervioso que se ha detectado calor. **(b)** La capsaicina imita los efectos del calor al abrir TRPV1 a bajas temperaturas, lo que comporta la falsa sensación de calor. La EC_{50} extremadamente baja indica que incluso cantidades muy pequeñas de capsaicina tienen efectos sensoriales espectaculares. **(c)** A bajas concentraciones el mentol debería abrir el canal TRPM8, con una sensación de frío; a concentraciones elevadas se abrirían tanto TRPM8 como TRPV3, llevando a una sensación mixta de frío y calor, tal como puede haber experimentado con caramelos de menta muy fuertes.

22. **(a)** Estas mutaciones podrían llevar a una activación permanente del receptor de PGE_2, lo que comportaría una división celular no regulada y formación de tumor. **(b)** El gen viral podría codificar una forma activa constitutiva del receptor, produciendo una señal constante para la división y, en consecuencia, la formación de un tumor. **(c)** La proteína E1A podría unirse a pRb impidiendo la unión de E2F, por lo que E2F es constantemente activo con lo que las células se dividen sin control. **(d)** Las células pulmonares normalmente no responden a la PGE_2 ya que no expresan el receptor de PGE_2; las mutaciones que dan lugar a un receptor de PGE_2 constantemente activo no afectan a las células pulmonares.

23. Un gen supresor tumoral normal codifica una proteína que reprime la división celular. Las formas mutantes de la proteína no pueden suprimir la división celular, pero si uno de los dos alelos del gen codifica una proteína normal, la función normal continúa. Un oncogén normal codifica una proteína reguladora que desencadena la división celular, pero sólo cuando está presente la señal celular adecuada (factor de crecimiento). La versión mutante del producto del oncogén envía constantemente una señal para que se divida la célula, tanto si están presentes factores de crecimiento como si no.

24. En un niño que desarrolla tumores múltiples en los dos ojos cada célula de la retina tenía una copia defectuosa del gen *Rb* en el momento del nacimiento. En edad temprana, varias células experimentaron independientemente una segunda mutación que dañó el restante alelo correcto del gen *Rb*, produciendo un tumor. Un niño que desarrolló un solo tumor tenía, al nacer, dos copias buenas del gen *Rb* en cada célula; la mutación en ambos alelos *Rb* en una célula (cosa extremadamente rara) produce un solo tumor.

25. Dos células que expresan el mismo receptor de superficie pueden tener complementos diferentes de proteínas diana para la fosforilación de proteínas.

26. **(a)** El modelo basado en la célula que predice receptores diferentes presentes en células diferentes. **(b)** Este experimento trata la cuestión de la independencia de diferentes sensaciones gustativas. Aunque no se encuentran los receptores para el dulce y/o el umami, las otras sensaciones gustativas de los animales son normales; así las sensaciones gustativas agradables y desagradables son independientes. **(c)** Sí. La pérdida de la subunidad T1R1 o la T1R3 eliminan la sensación del gusto umami. **(d)** Ambos modelos. Con cualquiera la eliminación de un receptor elimina la sensación de gusto. **(e)** Sí. La pérdida de la subunidad T1R2 o de la T1R3 elimina casi del todo la sensación del gusto dulce; la eliminación completa del gusto dulce requiere la eliminación de las dos subunidades. **(f)** A concentraciones de sacarosa muy elevadas, los receptores T1R2 y, en menor grado, T1R3, en forma de homodímeros, pueden detectar el gusto dulce. **(g)** Los resultados están de acuerdo con cualquiera de los modelos de codificación de gustos, pero refuerzan las conclusiones de los investigadores. La unión de lígando puede separarse completamente de la sensación gustativa. Si el ligando del receptor en las "células del gusto dulce" une una molécula, los ratones prefieren dicha molécula como compuesto dulce.

Capítulo 13

1. Se considera el polluelo en desarrollo como el sistema; los nutrientes, cáscara del huevo y mundo exterior, como el entorno. La transformación de la única célula en un polluelo reduce drásticamente la entropía del sistema. Inicialmente las partes del huevo fuera del embrión (el entorno) contienen moléculas de combustible complejas (condición de baja entropía). Durante la incubación, algunas de estas moléculas complejas se convierten en un gran número de moléculas de CO_2 y H_2O (entropía elevada). Este incremento de la entropía del entorno es superior al descenso de entropía del polluelo (el sistema).

2. **(a)** –4,8 kJ/mol **(b)** 7,56 kJ/mol **(c)** –13,7 kJ/mol

3 **(a)** 262 **(b)** 608 **(c)** 0,30

4. $K'_{eq} = 21$; $\Delta G'° = -7{,}6$ kJ/mol

5. –31 kJ/mol

6. **(a)** –1,68 kJ/mol **(b)** –4,4 kJ/mol **(c)** A una temperatura dada, el valor de $\Delta G'°$ de cualquier reacción está fijado y es definido por las condiciones estándar (aquí, tanto la fructosa 6-fosfato como la glucosa 6-fosfato a 1 M). Por el contrario ΔG es una variable que se puede calcular para cualquier conjunto de concentraciones de reactivo y producto.

7. $\Delta G'° \approx 0$; $K'_{eq} \approx 1$

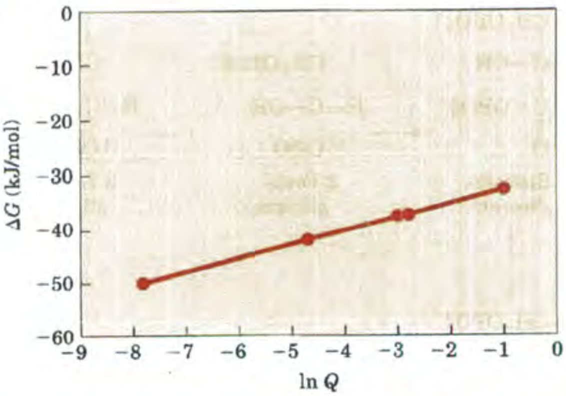
8. Menos. La ecuación global para la hidrólisis del ATP puede aproximarse:

$$ATP^{4-} + H_2O \rightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$

(Esto es sólo una aproximación porque las especies ionizadas mostradas aquí son las mayoritarias, pero no las únicas presentes.) En condiciones estándar (es decir, [ATP] = [ADP] = [P_i] = 1 M) la concentración de agua es 55 M y no cambia durante la reacción. Dado que se producen iones H^+ en la reacción, a una [H^+] más elevada (pH 5,0) el equilibrio estaría desplazado hacia la izquierda y se liberaría menos energía libre.

9. 10

10.



ΔG de la hidrólisis del ATP es menor cuando [ATP]/[ADP] es baja (<<1) que cuando [ATP]/[ADP] es elevada. La energía disponible para la célula a partir de una [ATP] dada es menor cuando la razón [ATP]/[ADP] disminuye y mayor cuando aumenta.

11. **(a)** $3{,}85 \times 10^{-3}$ M^{-1}; [glucosa 6-fosfato] = $8{,}9 \times 10^{-8}$ M; **(b)** 14 M; dado que la solubilidad máxima de la glucosa es inferior a 1 M éste no es un paso razonable. **(c)** 837 ($\Delta G'^{\circ} = -16{,}7$ kJ/mol); [glucosa] = $1{,}2 \times 10^{-7}$ M; sí. **(d)** No. Esto requeriría una [P_i] tan elevada que las sales de fosfato de cationes divalentes precipitarían. **(e)** Mediante la transferencia directa del grupo fosforilo del ATP a la glucosa, el potencial de transferencia de grupo fosforilo ("tendencia" o "presión") del ATP se utiliza sin generar elevadas concentraciones de intermedios. La parte esencial de esta transferencia es, por supuesto, la catálisis enzimática.

12. **(a)** –12,5 kJ/mol **(b)** –14,6 kJ/mol

13. **(a)** $3{,}1 \times 10^{-4}$ **(b)** 69 **(c)** $7{,}4 \times 10^{4}$

14. –13 kJ/mol

15. 46,7 kJ/mol

16. La isomerización mueve el grupo carbonilo de C-1 a C-2, estableciendo la rotura de un enlace carbono–carbono entre C-3 y C-4. Sin la isomerización, la rotura de enlace se produciría entre C-2 y C-3 generando un compuesto de dos carbonos y otro de cuatro.

17. El mecanismo es el mismo que el de la reacción de la alcohol deshidrogenasa (Fig. 14–13, p. 547).

18. El primer paso es el inverso de una condensación aldólica (véase el mecanismo de la aldolasa, Fig. 14–5, p. 534); el segundo paso es una condensación aldólica (véase la Fig. 13–4, p. 497).

19. **(a)** 46 kJ/mol **(b)** 46 kg; 68% **(c)** El ATP se sintetiza a medida que se necesita y a continuación se rompe a ADP y P_i; su concentración se mantiene en estado estacionario.

20. El sistema del ATP está en un estado estacionario dinámico; la [ATP] permanece constante porque la velocidad de consumo de ATP es igual a su velocidad de síntesis. El consumo de ATP supone la liberación del grupo fosforilo terminal (γ); la síntesis del ATP a partir de ADP implica reemplazar este grupo fosforilo. Por consiguiente, el fosfato terminal experimenta un recambio rápido. Por el contrario, el fosfato central (β) sólo experimenta un recambio relativamente lento.

21. **(a)** 1,7 kJ/mol **(b)** La pirofosfato inorgánico hidrolasa cataliza la hidrólisis del pirofosfato e impulsa la reacción neta hacia la síntesis de acetil-CoA.

22. 36 kJ/mol

23. **(a)** NAD^+/NADH **(b)** Piruvato/lactato **(c)** Formación de lactato **(d)** –26,1 kJ/mol **(e)** $3{,}63 \times 10^{4}$

24. **(a)** 1,14 V **(b)** –220 kJ/mol **(c)** ~ 4

25. **(a)** –0,35 V **(b)** –0,320 V **(c)** –0,29 V

26. En orden de aumento de la tendencia: **(a)**, **(d)**, **(b)**, **(c)**

27. **(c)** y **(d)**

28. **(a)** El estado de mínima energía y máxima entropía tiene lugar cuando la concentración de colorante es igual en ambas celdas. Si una unión en hendidura tipo "arte de pesca" permitiese el transporte unidireccional acabaría habiendo más colorante en el oligodendrocito y menos en el astrocito. Éste sería un estado de energía más elevada y de menor entropía que el estado inicial, lo que violaría la segunda ley de la termodinámica. El modelo de Robinson et al. requiere una disminución espontánea de entropía que es imposible. En términos energéticos el modelo impone un cambio espontáneo desde un estado de baja entropía a uno de energía más elevada sin un aporte de energía, lo que es termodinámicamente imposible. **(b)** Las moléculas, a diferencia de los peces, no muestran un *comportamiento dirigido*; se mueven al azar por movimiento browniano. La difusión da lugar a un movimiento *neto* de moléculas desde una región de mayor concentración a otra de menor concentración simplemente porque es más probable que una molécula en el lugar de concentración más elevada entre en el canal de conexión. Considere esto como una ruta con un paso limitante de velocidad: el extremo delgado del canal. El extremo más estrecho limita la velocidad a la que las moléculas pasan a través, ya que el movimiento al azar de las moléculas hace que sea menos probable que pasen a través de la sección transversal menor. El extremo ancho del canal *no* actúa como un embudo para las moléculas, aunque pueda hacerlo en el caso de los peces, ya que, a diferencia de los peces, las moléculas no se "acumulan" a los lados del embudo cada vez más estrecho. El extremo delgado limita la velocidad de movimiento de la misma manera en ambas direcciones. Cuando las concentraciones son iguales a ambos lados, las velocidades de movimiento en las dos direcciones son iguales, por lo que no se produce un cambio en la concentración. **(c)** Los peces muestran un *comportamiento no estadístico*, ajustando sus acciones en respuesta al entorno. Los peces que entran por el extremo más ancho del canal tienden a moverse hacia delante porque el comportamiento de los mismos tiende a preferir el movimiento hacia delante y experimentan "amontonamiento" cuando se desplazan a través del canal que se estrecha. Es fácil para los peces entrar por la abertura ancha, pero no salen fuera tan fácilmente porque es menos probable que entren por la abertura más estrecha. **(d)** Hay muchas explicaciones posibles, algunas de las cuales fueron propuestas por los autores de las cartas que criticaron el artículo. Aquí presentamos dos: (1) *El colorante podría haberse unido a una molécula del oligodendrocito.* La unión elimina de manera efectiva el colorante del grueso del disolvente, por lo que "no cuenta" como soluto en las consideraciones termodinámicas si bien continúa visible al microscopio de fluorescencia. (2) *El colorante podría haber sido secuestrado en un orgánulo subcelular del oligodendrocito*, ya sea bombeado de una manera activa a expensas de ATP o impulsado por su atracción a otras moléculas del orgánulo.

Capítulo 14

1. Ecuación neta: Glucosa + 2ATP → 2 gliceraldehído 3-fosfato + 2ADP + $2H^+$; $\Delta G'^{\circ} = 2{,}1$ kJ/mol

2. Ecuación neta: 2 Gliceraldehído 3-fosfato + 4ADP + $2P_i$ → 2 lactato + $2NAD^+$; $\Delta G'^{\circ} = -114$ kJ/mol

3. GLUT2 (y GLUT1) se encuentra en el hígado y está siempre presente en la membrana plasmática de los hepatocitos. GLUT3 se encuentra siempre en la membrana plasmática de ciertas células del cerebro. GLUT4 está secuestrado en vesículas de células de los tejidos muscular y adiposo y entra en la membrana plasmática sólo en respuesta a la insulina. Así, el hígado y el cerebro captan glucosa de la sangre independientemente del nivel de insulina mientras que los tejidos muscular y adiposo sólo captan glucosa cuando la concentración de insulina está elevada en respuesta a una glucosa sanguínea elevada.

4. $CH_3CHO + NADH + H^+ \rightleftharpoons CH_3CH_2OH + NAD^+$; $K'_{eq} = 1{,}45 \times 10^4$

5. –8,6 kJ/mol

6. **(a)** $^{14}CH_3CH_2OH$ **(b)** [3-^{14}C]glucosa o [4-^{14}C]glucosa

7. La fermentación libera energía, parte de ella conservada en forma de ATP, pero mucha más disipada en forma de calor. A menos que se refrigere el contenido del fermentador, la temperatura se elevará de modo suficiente para matar los microorganismos.

8. La soja y el trigo contienen almidón, un polímero de glucosa, que es degradado a glucosa por los microorganismos. La glucosa es a continuación degradada a piruvato vía glucólisis. Debido a que el proceso se lleva a cabo en ausencia de O_2 (es decir, es una fermentación), el piruvato pasa a ácido láctico y etanol. Si estuviese presente el O_2, el piruvato se oxidaría a acetil-CoA y seguidamente a CO_2 y H_2O. Sin embargo, parte del acetil-CoA también se hidrolizaría a ácido acético (vinagre) en presencia de oxígeno.

9. En C-1. Este experimento demuestra la reversibilidad de la reacción de la aldolasa. El C-1 del gliceraldehído 3-fosfato es equivalente al C-4 de la fructosa 1,6-bisfosfato (véase la Fig. 14–6). El gliceraldehído 3-fosfato inicial había de estar marcado en el C-1. El C-3 de la dihidroxiacetona fosfato se marca a través de la reacción de la triosa fosfato isomerasa, dando lugar de este modo a fructosa 1,6-bisfosfato marcada en C-3.

10. No. No habría producción anaeróbica de ATP; la producción aeróbica de ATP sólo disminuiría ligeramente.

11. No; la lactato deshidrogenasa se requiere para reciclar NAD^+ a partir del NADH formado durante la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato.

12. La transformación de glucosa en lactato tiene lugar cuando los miocitos tienen poco oxígeno y proporciona un modo de generar ATP en condiciones con deficiencia de oxígeno. Debido a que el lactato puede oxidarse a piruvato, no se malgasta la glucosa; el piruvato se oxida mediante reacciones aeróbicas cuando el O_2 vuelva a ser abundante. Esta flexibilidad metabólica proporciona al organismo una mayor capacidad para adaptarse al ambiente.

13. Elimina rápidamente el 1,3-bisfosfoglicerato en un paso posterior favorable, catalizado por la fosfoglicerato quinasa.

14. **(a)** El producto es el 3-fosfoglicerato. **(b)** En presencia de arseniato no hay síntesis neta de ATP en condiciones anaeróbicas.

15. **(a)** La fermentación alcohólica requiere 2 moles de P_i por mol de glucosa. **(b)** El etanol es el producto reducido formado durante la reoxidación del NADH a NAD^+ y CO_2 es el producto secundario de la conversión del piruvato en etanol. Sí; el piruvato debe convertirse en etanol para producir un suministro constante de NAD^+ para la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato. Se acumula fructosa 1,6-bisfosfato; se forma como intermediario en la glucólisis. **(c)** El arseniato reemplaza el P_i en la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa dando un acil arseniato que se hidroliza espontáneamente. Esto impide la formación de ATP, pero el 3-fosfoglicerato continúa a través de la ruta.

16. La niacina de la dieta se utiliza para sintetizar NAD^+. Las oxidaciones que utilizan NAD^+ forman parte de procesos cíclicos en los que el NAD^+ actúa como transportador de electrones (agente reductor). Una molécula de NAD^+ puede oxidar muchos miles de moléculas de glucosa y de este modo las necesidades dietéticas del precursor vitamínico (niacina) son relativamente pequeñas.

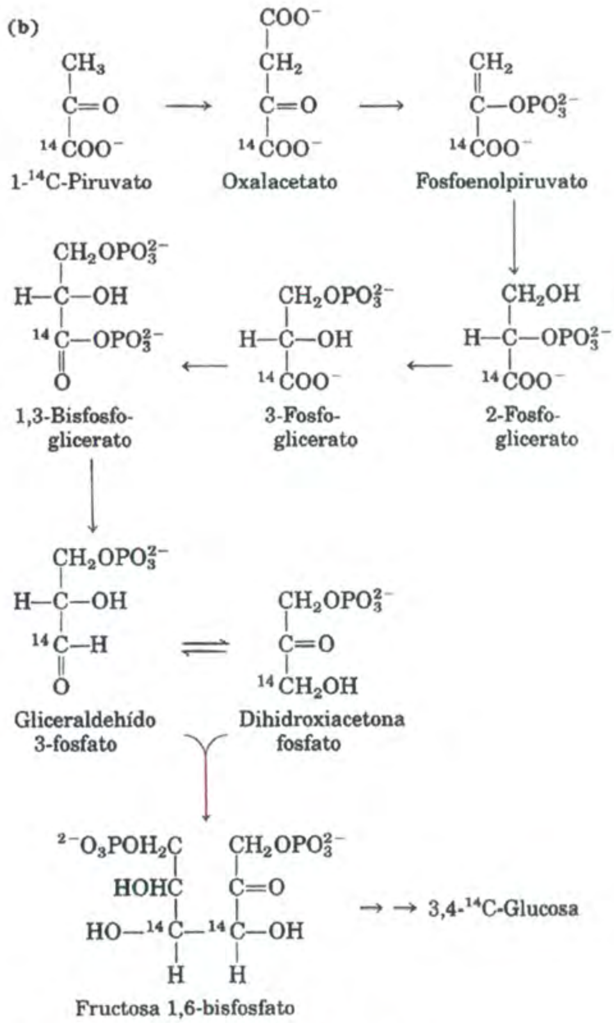
17. Dihidroxiacetona fosfato + NADH + H^+ → Glicerol 3-fosfato + NAD^+ (catalizada por una deshidrogenasa)

18. *Deficiencia de galactoquinasa:* galactosa (menos tóxica); *deficiencia de UDP-glucosa:galactosa 1-fosfato uridilil transferasa:* galactosa 1-fosfato (más tóxica).

19. Las proteínas se han degradado a aminoácidos y éstos se han utilizado para la gluconeogénesis.

20. **(a)** En la reacción de la piruvato carboxilasa se añade $^{14}CO_2$ al piruvato, pero la PEP carboxiquinasa elimina *el mismo* CO_2 en la etapa siguiente. Así, el ^{14}C no es (inicialmente) incorporado a la glucosa.

(b)



21. 4 equivalentes de ATP por molécula de glucosa.

22. La gluconeogénesis sería muy endergónica y sería imposible regular de forma separada gluconeogénesis y glucólisis.

23. La célula "gasta" 1 ATP y 1 GTP durante la conversión del piruvato en PEP.

24. **(a)**, **(b)**, **(d)** son glucogénicos; **(c)** **(e)** no lo son.

25. El consumo de alcohol fuerza una competición por el NAD^+ entre el metabolismo del etanol y la gluconeogénesis. El problema viene agravado por el ejercicio vigoroso y la falta de alimento porque en esos momentos el nivel de glucosa sanguínea ya es bajo.

26. **(a)** El rápido incremento en la glucólisis; el aumento del piruvato y del NADH produce un aumento del lactato. **(b)** El lactato se transforma en glucosa vía piruvato; éste es un proceso más lento porque la formación de piruvato está limitada por la disponibilidad de NAD^+, el equilibrio de la LDH favorece al lactato y la conversión de piruvato en glucosa requiere energía. **(c)** El equilibrio de la reacción de la LDH favorece la formación de lactato.

27. El lactato se transforma en glucosa en el hígado por la gluconeogénesis (véanse las Figs. 14–15, 14–16). Un defecto en la FBPasa-1 impediría la entrada de lactato en la vía gluconeogénica en los hepatocitos dando lugar a la acumulación de lactato en la sangre.

28. El succinato se transforma en oxalacetato el cual pasa al citosol y se transforma en PEP por la PEP carboxiquinasa. Se requieren, por tanto, dos moles de PEP para producir un mol de glucosa mediante la ruta esbozada en la Figura 14–16.

29. Si las rutas catabólica y anabólica del metabolismo de la glucosa operan a la vez hay un ciclado inútil del ATP con consumo extra de O_2.

30. Como mínimo, la acumulación de ribosa 5-fosfato tendería a forzar esta reacción en la dirección inversa por acción de masas (véase la

Ec. 13–4, p. 493). También podría afectar a otras reacciones metabólicas en las que interviene la ribosa 5-fosfato como sustrato o producto, tales como las rutas de la síntesis de nucleótidos.

31. **(a)** Es probable que en la tolerancia al etanol intervengan muchos más genes por lo que la modificación genética sería un proyecto mucho más complejo. **(b)** La L-arabinosa isomerasa (el enzima *araA*) convierte una aldosa en una cetosa al cambiar el carbonilo de un azúcar no fosforilado de C-1 a C-2. En este capítulo no se discute ningún enzima análogo; todos los enzimas aquí descritos actúan sobre azúcares fosforilados. Un enzima que lleva a cabo una transformación similar con azúcares fosforilados es la fosfohexosa isomerasa. La L-ribuloquinasa (*araB*) fosforila un azúcar en C-5 por transferencia del fosfato en γ del ATP. En este capítulo se describen muchas reacciones de este tipo, entre ellas la reacción de la hexoquinasa. La L-ribulosa 5-fosfato epimerasa (*araD*) intercambia los grupos —H y —OH en un carbono quiral de un azúcar. En este capítulo no se describe ninguna reacción análoga pero sí que se describe en el Capítulo 20 (véase la Fig. 20–1, p. 774). **(c)** Los tres enzimas *ara* convertirían la arabinosa en xilulosa 5-fosfato mediante la ruta siguiente: arabinosa $\xrightarrow{\text{L-arabinosa isomerasa}}$ L-ribulosa $\xrightarrow{\text{L-ribuloquinasa}}$ L-ribulosa 5-fosfato $\xrightarrow{\text{epimerasa}}$ xilulosa 5-fosfato. **(d)** La arabinosa se convierte en xilulosa 5-fosfato igual que en (c), y ésta entra en la ruta de la Fig. 14–22; el producto glucosa 6-fosfato fermenta a continuación a etanol y CO_2. **(e)** 6 moléculas de arabinosa + 6 moléculas de ATP se convierten en 6 moléculas de xilulosa 5-fosfato que alimentan la ruta de la Fig. 14–22 para dar 5 moléculas de glucosa 6-fosfato, cada una de las cuales es fermentada dando 3 ATP (entran en forma de glucosa 6-fosfato, no glucosa), es decir, 15 ATP en total. En conjunto, se esperaría un rendimiento de 15 ATP – 6 ATP = 9 ATP a partir de 6 moléculas de arabinosa. Los otros productos son 10 moléculas de etanol y 10 moléculas de CO_2. **(f)** Dado el menor rendimiento en ATP, para una cantidad determinada de crecimiento (es decir, de disponibilidad de ATP) equivalente al crecimiento sin los genes añadidos, el *Z. mobilis* modificado ha de fermentar más arabinosa, por lo que produce de este modo más etanol. **(g)** Una forma de permitir la utilización de xilosa sería añadir los genes de dos enzimas: un análogo del enzima *araD* que convierta xilosa en ribosa al cambiar el —H y el —OH en C-3, y un análogo del enzima *araB* que fosforile la ribosa en C-5. La ribosa 5-fosfato resultante alimentaría la ruta existente.

Capítulo 15

1. **(a)** 0,0293 **(b)** 308 **(c)** No. *Q* es mucho menor que K'_{eq}, lo que indica que la reacción de la PFK-1 está lejos del equilibrio en las células; esta reacción es más lenta que las reacciones siguientes de la glucólisis. El flujo a través de la vía glucolítica está en gran medida determinado por la actividad PFK-1.

2. **(a)** $1{,}4 \times 10^{-9}$ M **(b)** La concentración fisiológica (0,023 mM) es 16.000 veces superior a la concentración de equilibrio; esta reacción no alcanza el equilibrio en la célula. Muchas reacciones celulares no se encuentran en equilibrio.

3. En ausencia de O_2 las necesidades de ATP son cubiertas por el metabolismo anaeróbico de la glucosa (fermentación a lactato). Como la oxidación aeróbica de la glucosa produce mucho más ATP que la fermentación, se necesita menos glucosa para producir la misma cantidad de ATP.

4. **(a)** Hay dos sitios de unión para el ATP: uno catalítico y uno regulador. La unión del ATP a un sitio regulador inhibe la PFK-1, ya sea por reducción de la V_{max}, ya sea aumentando la K_m del ATP en el sitio catalítico. **(b)** El flujo glucolítico está reducido cuando hay abundancia de ATP. **(c)** La gráfica indica que el incremento de la [ADP] suprime la inhibición del ATP. Debido a que el fondo de nucleótidos de adenina es bastante constante, el consumo de ATP conduce a un incremento de [ADP]. Los datos indican que la actividad de la PFK-1 puede estar regulada por la razón [ATP]/[ADP].

5. El grupo fosfato de la glucosa 6-fosfato está completamente ionizado a pH 7, lo que otorga a la molécula una carga negativa global. Debido a que las membranas son generalmente impermeables a moléculas cargadas eléctricamente, la glucosa 6-fosfato no puede pasar del torrente circulatorio a las células, por lo que no puede entrar en la vía glucolítica y generar ATP. (Éste es el motivo por el que la glucosa, una vez fosforilada, no puede escapar de la célula.)

6. **(a)** *En el músculo:* la degradación del glucógeno suministra energía (ATP) vía glucólisis. La glucógeno fosforilasa cataliza la conversión del glucógeno almacenado en glucosa 1-fosfato, la cual se convierte en glucosa 6-fosfato, un intermediario de la glucólisis. Durante la actividad vigorosa, el músculo esquelético requiere grandes cantidades de glucosa 6-fosfato. *En el hígado:* la degradación del glucógeno mantiene un nivel estable de glucosa sanguínea entre comidas (la glucosa 6-fosfato se convierte en glucosa libre). **(b)** En el músculo en trabajo activo, las necesidades de flujo de ATP son muy elevadas por lo que la glucosa 1-fosfato se ha de producir muy rápidamente, lo que requiere una elevada V_{max}.

7. **(a)** $[P_i]$/[glucosa 1-fosfato] = 3,3/1 **(b)** y **(c)** El valor de esta razón en la célula (>100:1) indica que la [glucosa 1-fosfato] está muy por debajo del valor de equilibrio. La velocidad a la que se elimina la glucosa 1-fosfato (mediante su entrada en la glucólisis) es mayor que su velocidad de producción (por la reacción de la glucógeno fosforilasa), por lo que el flujo metabólico va del glucógeno a la glucosa 1-fosfato. La reacción de la glucógeno fosforilasa es probablemente la etapa reguladora en la degradación del glucógeno.

8. **(a)** Aumenta **(b)** Disminuye **(c)** Aumenta

9. *En reposo:* [ATP] elevada; [AMP] baja; [acetil-CoA] y [citrato] intermedias. *Corriendo:* [ATP] intermedia; [AMP] elevada; [acetil-CoA] y [citrato] bajas. El flujo de glucosa a través de la glucólisis aumenta durante el esprint anaeróbico porque (1) la inhibición por el ATP de la glucógeno fosforilasa y de la PFK-1 está parcialmente liberada, (2) el AMP estimula ambos enzimas y (3) los niveles de citrato y acetil-CoA menores liberan sus efectos inhibidores sobre la PFK-1 y la piruvato quinasa, respectivamente.

10. Las aves migratorias dependen de la oxidación aeróbica altamente eficiente de grasas y no del metabolismo anaeróbico de la glucosa utilizado por un conejo corriendo. Las aves reservan su glucógeno muscular para cortos momentos de necesidad energética muy grande en situaciones de emergencia.

11. *Caso A:* (f), (3); *Caso B:* (c), (3); *Caso C:* (h), (4); *Caso D:* (d), (6)

12. **(a)** (1) Adiposo: síntesis de ácidos grasos más lenta. (2) Músculo: glucólisis, síntesis de ácidos grasos y síntesis de glucógeno más lenta. (3) Hígado: glucólisis más rápida; gluconeogénesis, síntesis de glucógeno y síntesis de ácidos grasos más lenta; ruta de las pentosas fosfato sin cambios. **(b)** (1) Adiposo y (3) hígado: síntesis de ácidos grasos más lenta debido a que la falta de insulina da como resultado la inactivación de la acetil-CoA carboxilasa, primer enzima de la síntesis de ácidos grasos. La síntesis de glucógeno inhibida por la fosforilación dependiente de cAMP (por tanto, inactivación) de la glucógeno sintasa. (2) Músculo: glucólisis más lenta porque GLUT4 es inactivo por lo que está inhibida la captación de glucosa. (3) Hígado: glucólisis más lenta porque la PFK-2/FBPasa-2 bifuncional se convierte en la forma con FBPasa-2 activa que disminuye la [fructosa 2,6-bisfosfato], que estimula alostéricamente la fosfofrutoquinasa e inhibe la FBPasa-1; esto también explica el estímulo de la gluconeogénesis.

13. **(a)** Elevada **(b)** Elevada **(c)** Elevada

14. **(a)** No se puede activar la PKA en respuesta al glucagón o adrenalina y la glucógeno fosforilasa no está activada. **(b)** PP1 permanece activa, lo que permite desfosforilar la glucógeno sintasa (activándola) y la glucógeno fosforilasa (inhibiéndola). **(c)** La fosforilasa permanece fosforilada (activa) aumentando la degradación del glucógeno. **(d)** No se puede estimular la gluconeogénesis cuando la glucosa sanguínea es baja, lo que lleva a una glucosa en sangre peligrosamente baja durante los períodos de ayuno.

15. El descenso de la glucosa sanguínea desencadena la liberación de glucagón por el páncreas. En el hígado, el glucagón activa la glucógeno fosforilasa estimulando su fosforilación dependiente de cAMP y estimula la gluconeogénesis al disminuir [fructosa 2,6-bisfosfato], estimulando así la FBPasa-1.

16. **(a)** Capacidad reducida de movilización de glucógeno, glucosa sanguínea disminuida entre comidas. **(b)** Capacidad reducida de disminuir la glucosa sanguínea después de una comida rica en glúcidos; glucosa sanguínea elevada. **(c)** Fructosa 2,6-bisfosfato (F26BP) reducida en el hígado que estimula la glucólisis e inhibe la gluconeogénesis. **(d)** F26BP reducida, lo que estimula la gluconeogénesis e inhibe la glucólisis. **(e)** Aumento de la captación de ácidos grasos y glucosa; aumento de la oxidación de ambos. **(f)** Aumento de la conversión de piruvato en acetil-CoA; aumento de la síntesis de ácidos grasos.

17. **(a)** Dado que cada partícula contiene unos 55.000 residuos de glucosa, la concentración equivalente de glucosa libre sería 55.000 × 0,01 μM = 550 mM o 0,55 M. ¡Supondría un reto osmótico serio para la célula! (Los fluidos corporales tienen una osmolaridad significativamente más baja.) **(b)** Cuanto menor el número de ramificaciones menor el número de extremos libres asequibles a la actividad de la glucógeno fosforilasa y menor la velocidad de liberación de glucosa. Sin ramificaciones sólo habría un sitio en que podría actuar la fosforilasa. **(c)** El nivel exterior de la partícula estaría demasiado poblado con residuos de glucosa para que el enzima pudiese acceder a los enlaces para romperlos y liberar glucosa. **(d)** El número de cadenas se dobla en cada nivel sucesivo: el nivel 1 tiene una cadena (2^0), el nivel 2 tiene dos (2^1), el nivel 3 tiene cuatro (2^2) y así sucesivamente. Para t niveles, el número de cadenas en el nivel más externo, C_A, es 2^{t-1}. **(e)** El número total de cadenas es $2^0 + 2^1 + 2^2 + \dots 2^{t-1} = 2^t - 1$. Cada cadena contiene g_c moléculas de glucosa, por lo que el número total de moléculas de glucosa C_T es $g_c\,(2t - 1)$. **(f)** La glucógeno fosforilasa puede liberar todos los residuos de glucosa menos cuatro en una cadena de longitud g_c. Por tanto, de cada cadena del nivel exterior puede liberar $(g_c - 4)$ moléculas de glucosa. Dado que hay 2^{t-1} cadenas en el nivel exterior, el número de moléculas de glucosa que puede liberar el enzima, G_{PT}, es $(g_c - 4)(2^{t-1})$. **(g)** El volumen de una esfera es $\frac{4}{3}\pi r^3$. En este caso, r es el grosor de un nivel multiplicado por el número de niveles, o $(0{,}12g_c + 0{,}35)t$ nm. Así, $V_s = \frac{4}{3}\pi t^3(0{,}12g_c + 0{,}35)^3$ nm^3.
(h) Puede demostrar algebraicamente que el valor de g_c que hace que f sea máxima es independiente de t. Tomando $t = 3$:

g_c	C_A	G_T	G_{PT}	V_s	F
5	4	35	4	11	5,8
6	4	42	8	19	9,7
7	4	49	12	24	12
8	4	56	16	28	14
9	4	63	20	32	15
10	4	70	24	34	16
11	4	77	28	36	16
12	4	84	32	38	17
13	4	91	36	40	17
14	4	98	40	41	17
15	4	100	44	42	16
16	4	110	48	43	16

El valor óptimo de g_c (es decir el valor máximo de f) es 13. En la naturaleza, g_c varía de 12 a 14, lo que corresponde a valores de f muy próximos al óptimo. Si escoge otro valor de t, los números serán diferentes pero el g_c óptimo continuará siendo 13.

Capítulo 16

1. **(a)**
① *Citrato sintasa:*
Acetil-CoA + oxalacetato + H_2O → citrato + CoA
② *Aconitasa:*
Citrato → isocitrato
③ *Isocitrato deshidrogenasa:*
Isocitrato + NAD^+ → α-cetoglutarato + CO_2 + NADH
④ *α-Cetoglutarato deshidrogenasa:*
α-Cetoglutarato + NAD^+ + CoA → succinil-CoA + CO_2 + NADH
⑤ *Succinil-CoA sintetasa:*
Succinil-CoA + P_i + GDP → succinato + CoA + GTP
⑥ *Succinato deshidrogenasa:*
Succinato + FAD → fumarato + $FADH_2$
⑦ *Fumarasa:*
Fumarato + H_2O → malato
⑧ *Malato deshidrogenasa:*
Malato + NAD^+ → oxalacetato + NADH + H^+
(b), (c) ① CoA, condensación; ② ninguno, isomerización; ③ NAD^+, descarboxilación oxidativa; ④ NAD^+, CoA, y tiamina pirofosfato, descarboxilación oxidativa; ⑤ CoA, fosforilación a nivel de sustrato; ⑥ FAD, oxidación; ⑦ ninguno, hidratación; ⑧ NAD^+, oxidación
(d) Acetil-CoA + $3NAD^+$ + FAD + GDP + P_i + $2H_2O$ → $2CO_2$ + CoA + 3NADH + $FADH_2$ + GTP + $2H^+$

2. Glucosa + 4ADP + $4P_i$ + $10NAD^+$ + 2FAD → 4ATP + 10NADH + $2FADH_2$ + $6CO_2$

3. **(a)** Oxidación; metanol → formaldehído + [H—H]
(b) Oxidación; formaldehído → formiato + [H—H]
(c) Reducción; CO_2 + [H—H] → formiato + H^+
(d) Reducción; glicerato + H^+ + [H—H] → gliceraldehído + H_2O
(e) Oxidación; glicerol → dihidroxiacetona + [H—H]
(f) Oxidación; $2H_2O$ + tolueno → benzoato + H^+ + 3 [H—H]
(g) Oxidación; succinato → fumarato + [H—H]
(h) Oxidación; piruvato + H_2O → acetato + CO_2 + [H—H]

4. A partir de las fórmulas estructurales, vemos que la razón H/C del ácido hexanoico (11/6) es mayor que la de la glucosa (7/6). El ácido hexanoico está más reducido y produce más energía en su combustión completa a CO_2 y H_2O.

5. **(a)** Oxidado; etanol + NAD^+ → acetaldehído + NADH + H^+
(b) Reducido; 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H^+ → gliceraldehído 3-fosfato + NAD^+ + HPO_4^{2-}
(c) Sin cambio; piruvato + H^+ → acetaldehído + CO_2
(d) Oxidado; piruvato + NAD^+ → acetato + CO_2 + NADH + H^+
(e) Reducido; oxalacetato + NADH + H^+ → malato + NAD^+
(f) Sin cambio; acetoacetato + H^+ → acetona + CO_2

6. *TPP:* el anillo de tiazolio se adiciona al carbono α del piruvato, a continuación estabiliza el carbanión resultante al actuar como sumidero electrónico. *Ácido lipoico:* oxida el piruvato a nivel de acetato (acetil-CoA) y activa el acetato en forma de tioéster. *CoA-SH:* activa el acetato en forma de tioéster. *FAD:* oxida el ácido lipoico. *NAD^+:* oxida el FAD.

7. La carencia de TPP inhibe la piruvato deshidrogenasa; se acumula piruvato.

8. Descarboxilación oxidativa; NAD^+ o $NADP^+$; α-cetoglutarato deshidrogenasa

9. El consumo de oxígeno es una medida de la actividad de las dos primeras fases de la respiración celular: glucólisis y ciclo del ácido cítrico. La adición de oxalacetato o malato estimula el ciclo del ácido cítrico y así estimula la respiración. El oxalacetato o malato añadidos tienen un papel catalítico ya que se regeneran en la última parte del ciclo del ácido cítrico.

10. **(a)** $5{,}6 \times 10^{-6}$ **(b)** $1{,}1 \times 10^{-8}$ M **(c)** 28 moléculas

11. ADP (o GDP), P_i, CoA-SH, TPP, NAD^+; *no* ácido lipoico que está unido covalentemente a los enzimas aislados que lo utilizan.

12. Los nucleótidos de flavina, FMN y FAD, no se podrían sintetizar. Debido a que se requiere FAD en el ciclo del ácido cítrico, la carencia de flavina inhibiría el ciclo fuertemente.

13. *El oxalacetato podría separarse para la síntesis de aspartato o para la gluconeogénesis.* El oxalacetato se repone mediante las reacciones anapleróticas catalizadas por la PEP carboxiquinasa, la PEP carboxilasa, el enzima málico o la piruvato carboxilasa (véase la Fig. 16–15, p. 632).

14. El grupo fosforilo terminal del GTP puede transferirse al ADP en una reacción catalizada por la nucleósido difosfato quinasa que tiene una constante de equilibrio de 1,0: GTP + ADP → GDP + ATP

15. **(a)** $^-OOC—CH_2–CH_2–COO^-$ (succinato) **(b)** El malonato es un inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa. **(c)** Un bloqueo en el ciclo del ácido cítrico detiene la formación de NADH, lo que detiene la transferencia electrónica, lo que detiene la respiración. **(d)** Un gran exceso de succinato (sustrato) supera la inhibición competitiva.

16. **(a)** Añada [^{14}C]glucosa marcada uniformemente y compruebe la liberación de $^{14}CO_2$. **(b)** Distribuido igualmente entre C-2 y C-3 del oxalacetato; un número infinito.

17. El oxalacetato se equilibra con el succinato, en el que C-1 y C-4 son equivalentes. El oxalacetato procedente del succinato está marcado en C-1 y C-4 y el PEP procedente del mismo tiene una marca en C-1, lo que da lugar al C-3 y C-4 de la glucosa.

18. **(a)** C-1 **(b)** C-3 **(c)** C-3 **(d)** C-2 (grupo metilo) **(e)** C-4 **(f)** C-4 **(g)** Distribuido uniformemente entre C-2 y C-3

19. Se requiere tiamina para la síntesis de TPP, un grupo prostético de los complejos enzimáticos de la piruvato deshidrogenasa y de la α-cetoglutarato deshidrogenasa. La deficiencia de tiamina reduce la actividad de estos complejos enzimáticos y produce la acumulación de precursores observada.

20. No. Por cada dos carbonos que entran como acetato, dos dejan el ciclo en forma de CO_2; así, no hay síntesis neta de oxalacetato. La síntesis neta de oxalacetato tiene lugar por carboxilación del piruvato, una reacción anaplerótica.

21. Sí, el ciclo del ácido cítrico estaría inhibido. El oxalacetato está presente a concentraciones relativamente bajas en la mitocondria y su eliminación por la gluconeogénesis tendería a desplazar el equilibrio de la reacción de la citrato sintasa hacia el oxalacetato.

22. **(a)** Inhibición de la aconitasa. **(b)** Fluorocitrato; compite con el citrato; mediante un gran exceso de citrato. **(c)** El citrato y el fluorocitrato son inhibidores de la PFK-1. **(d)** Todos los procesos catabólicos necesarios para la producción de ATP están desconectados.

23. *En la glucólisis:*

$$\text{Glucosa} + 2P_i + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{ piruvato} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2H^+ + 2H_2O$$

Reacción de la piruvato carboxilasa:

$$2\text{ Piruvato} + 2CO_2 + 2\text{ATP} + 2H_2O \rightarrow 2\text{ oxalacetato} + 2\text{ADP} + 2P_i + 4H^+$$

Reacción de la malato deshidrogenasa:

$$2\text{ Oxalacetato} + 2\text{NADH} + 2H^+ \rightarrow 2\text{ L-malato} + 2\text{NAD}^+$$

Esto recicla los coenzimas de nicotinamida en condiciones anaeróbicas. La reacción global es

$$\text{Glucosa} + 2CO_2 \rightarrow 2\text{ L-malato} + 4H^+$$

Esto produce cuatro H^+ por glucosa, lo que incrementa la acidez del vino.

24. Reacción neta: $2\text{ Piruvato} + \text{ATP} + 2\text{NAD}^+ + H_2O \rightarrow \alpha\text{-cetoglutarato} + CO_2 + \text{ADP} + P_i + 2\text{NADH} + 3H^+$

25. El ciclo participa en procesos catabólicos y anabólicos. Por ejemplo, genera ATP por oxidación de sustrato pero también proporciona precursores para la síntesis de aminoácidos (véase la Fig. 16–15, p. 632).

26. **(a)** Disminuye **(b)** Aumenta **(c)** Disminuye

27. **(a)** El citrato se obtiene a partir de la acción de la citrato sintasa sobre el oxalacetato y el acetil-CoA. Se puede usar la citrato sintasa para la síntesis neta de citrato cuando (1) hay un flujo continuo de oxalacetato nuevo y acetil-CoA y (2) está restringida la síntesis de isocitrato tal como sucede en un medio pobre en Fe^{3+}. La aconitasa precisa Fe^{3+} por lo que un medio deficiente en Fe^{3+} restringe la síntesis de aconitato.
(b) Sacarosa + H_2O → glucosa + fructosa

$$\text{Glucosa} + 2P_i + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{ piruvato} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2H^+ + 2H_2O$$

$$\text{Fructosa} + 2P_i + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{ piruvato} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2H^+ + 2H_2O$$

$$2\text{ Piruvato} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{CoA} \rightarrow 2\text{ acetil-CoA} + 2\text{NADH} + 2H^+ + 2CO_2$$

$$2\text{ Piruvato} + 2CO_2 + 2\text{ATP} + 2H_2O \rightarrow 2\text{ oxalacetato} + 2\text{ADP} + 2P_i + 4H^+$$

$$2\text{ Acetil-CoA} + 2\text{ oxalacetato} + 2H_2O \rightarrow 2\text{ citrato} + 2\text{CoA}$$

La reacción global es

$$\text{Sacarosa} + H_2O + 2P_i + 2\text{ADP} + 6\text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{ citrato} + 2\text{ATP} + 6\text{NADH} + 10H^+$$

(c) La reacción global consume NAD^+. Debido a que el fondo celular de este coenzima oxidado es limitado debe reciclarse por la cadena de transporte electrónico con consumo de O_2. En consecuencia, la conversión global de sacarosa en ácido cítrico es un proceso aeróbico y requiere oxígeno molecular.

28. El succinil-CoA es un intermediario del ciclo del ácido cítrico; su acumulación señala un flujo reducido a través del ciclo, lo que exige una reducción en la entrada de acetil-CoA en el ciclo. La citrato sintasa, al regular la ruta oxidativa principal de la célula, regula también el suministro de NADH y de este modo el flujo de electrones desde el NADH al O_2.

29. El catabolismo de los ácidos grasos aumenta la [acetil-CoA] lo que estimula la piruvato carboxilasa. El incremento resultante en la [oxalacetato] estimula el consumo de acetil-CoA por el ciclo del ácido cítrico y la [citrato] aumenta con lo que se inhibe la glucólisis a nivel de la PFK-1. Además, la [acetil-CoA] aumentada inhibe el complejo de la piruvato deshidrogenasa haciendo que la utilización del piruvato procedente de la glucólisis sea más lenta.

30. El oxígeno es necesario para reciclar el NAD^+ a partir del NADH producido por las reacciones de oxidación del ciclo del ácido cítrico. La reoxidación del NADH tiene lugar durante la fosforilación oxidativa mitocondrial.

31. La $[NADH]/[NAD^+]$ aumentada inhibe el ciclo del ácido cítrico por acción de masas en los tres pasos de reducción del NAD^+; una [NADH] elevada desplaza el equilibrio hacia NAD^+.

32. Hacia el citrato; la ΔG para la reacción de la citrato sintasa en estas condiciones es de alrededor de –8, kJ/mol.

33. Los pasos ④ y ⑤ son esenciales en la reoxidación del cofactor lipoamida reducido del enzima.

34. El ciclo del ácido cítrico es tan central en el metabolismo que un defecto serio en cualquier enzima del ciclo sería probablemente letal para el embrión.

35. El primer enzima de cada ruta está bajo regulación alostérica recíproca. La inhibición de una ruta desvía el isocitrato hacia la otra.

36. **(a)** La única reacción en el tejido muscular que consume cantidades significativas de oxígeno, es la respiración celular, por lo que el consumo de O_2 es una buena medida de la respiración. **(b)** El tejido muscular recién preparado contiene algo de glucosa residual; el consumo de O_2 es debido a la oxidación de la glucosa. **(c)** Sí. Debido a que la cantidad de O_2 consumido aumentó cuando se añadió citrato o 1-fosfoglicerol, los dos pueden servir como sustrato para la respiración celular en este sistema. **(d)** *Experimento I:* el citrato está produciendo mucho más consumo de O_2 que lo que sería de esperar de su oxidación completa. Parece que cada molécula de citrato está actuando como si fuera más de una molécula. La única explicación posible es que cada molécula de citrato funciona más de una vez en la reacción, que es el modo en que opera un catalizador. *Experimento II:* la clave es calcular el exceso de O_2 consumido por cada muestra en comparación con el control (muestra 1).

Muestra	Sustrato(s) añadido(s)	μL O_2 absorbidos	Exceso de μL O_2 consumidos
1	Ninguno extra	342	0
2	0,3 mL 1-fosfoglicerol 0,2 M	757	415
3	0,15 mL citrato 0,2 M	431	89
4	0,3 mL 1-fosfoglicerol 0,2 M + 0,15 mL citrato 0,02 M	1.385	1.043

Si tanto el citrato como el 1-fosfoglicerol fueran simples sustratos de la reacción, se esperaría que el consumo de O_2 de la muestra 4 fuese la suma de los consumos individuales en exceso de las muestras 2 y 3 (415 μL + 89 μL = 504 μL). Pero el consumo en exceso cuando están presentes los dos sustratos es aproximadamente el doble (1.043 μL). Así, el citrato aumenta la capacidad del tejido para metabolizar el 1-fosfoglicerol. Este comportamiento es típico de un catalizador. Se necesitan los dos experimentos (I y II) para que el caso sea convincente. Basándose sólo en el experimento I, el citrato acelera la reacción, pero no queda claro si actúa ayudando al metabolismo del sustrato o por otro mecanismo. Basándose sólo en el experimento II, no está claro qué molécula es el catalizador, el citrato o el 1-fosfoglicerol. Juntos, los experimentos muestran que el citrato actúa como un "catalizador" en la oxidación del 1-fosfoglicerol. **(e)** Dado que la ruta puede consumir citrato (véase la muestra 3), si el citrato actúa como un catalizador ha de regenerarse. Si el conjunto de reacciones primero consume y luego regenera el citrato, ha de haber una ruta circular y no lineal. **(f)** Cuando la ruta está bloqueada en la α-cetoglutarato deshidrogenasa, el citrato se convierte en α-cetoglutarato pero la ruta no va más lejos. El oxígeno es consumido por la reoxidación del NADH producido por la isocitrato deshidrogenasa.

(g)

Esto difiere de la Fig. 16–7 en que no se incluyen el *cis*-aconitato y el isocitrato (entre citrato y α-cetoglutarato), o succinil-CoA o acetil-CoA. **(h)** Fue esencial establecer una conversión cuantitativa para descartar una ruta ramificada u otra más compleja.

Capítulo 17

1. La porción ácido graso; los carbonos de los ácidos grasos están más reducidos que los del glicerol.
2. **(a)** $4{,}0 \times 10^5$ kJ ($9{,}6 \times 10^4$ kcal) **(b)** 48 días **(c)** 0,48 lb/día
3. El primer paso en la oxidación de los ácidos grasos es análogo a la conversión de succinato en fumarato; el segundo paso, a la conversión de fumarato en malato; el tercer paso a la conversión de malato en oxalacetato.
4. 7 ciclos; el último libera 2 acetil-CoA.
5. **(a)** R—COO$^-$ + ATP → acil-AMP + PP_i
   Acil-AMP + CoA → acil-CoA + AMP
   (b) Hidrólisis irreversible de PP_i a $2P_i$ por la pirofosfato inorgánico hidrolasa celular
6. *cis*-Δ^3-dodecanil-CoA; se convierte en *cis*-Δ^2-dodecanil-CoA y a continuación en β-hidroxidodecanil-CoA.
7. 4 acetil-CoA y 1 propionil-CoA
8. Sí. Se elimina parte del tritio del palmitato durante las reacciones de deshidrogenación de la β-oxidación. El tritio eliminado aparece como agua tritiada.
9. Los grupos acilo graso condensados con el CoA en el citosol se transfieren primero a la carnitina, liberando CoA y luego se transportan a la mitocondria en donde se condensan de nuevo con CoA. Los fondos citosólico y mitocondrial de CoA se mantienen separados por lo que no entra CoA radiactivo desde el fondo citosólico al mitocondrial.
10. **(a)** En la paloma predomina la β-oxidación; en el faisán, la glucólisis anaeróbica del glucógeno. **(b)** El músculo de paloma consumiría más O_2. **(c)** La grasa contiene más energía por gramo que el glucógeno. Además, la degradación anaeróbica del glucógeno está limitada por la tolerancia del tejido a la acumulación de lactato. Así, la paloma, que opera sobre el catabolismo oxidativo de las grasas, es el volador de gran distancia. **(d)** Estos enzimas son los reguladores de sus rutas respectivas y así limitan la velocidad de producción de ATP.
11. El malonil-CoA ya no inhibiría más la entrada de ácidos grasos en la mitocondria y la β-oxidación por lo que habría un ciclo inútil o síntesis de ácidos grasos en el citosol y degradación simultánea de ácidos grasos en la mitocondria.
12. **(a)** La entrada de ácidos grasos a la mitocondria facilitada por la carnitina es el paso limitante de velocidad en la oxidación de los ácidos grasos. La deficiencia de carnitina hace más lenta la oxidación de los ácidos grasos; la carnitina añadida aumenta su velocidad. **(b)** Todos ellos aumentan la necesidad metabólica de oxidación de ácidos grasos. **(c)** La deficiencia de carnitina podría provenir de una deficiencia en lisina, su precursor, o de un defecto en uno de los enzimas de la ruta biosintética de la carnitina.
13. La oxidación de las grasas libera agua metabólica; 1,4 L de agua por kg de tripalmitilglicerol (se desprecia la pequeña contribución del glicerol a la masa).
14. Las bacterias se pueden utilizar para oxidar completamente los hidrocarburos a CO_2 y H_2O. Sin embargo, puede resultar difícil conseguir el contacto entre los hidrocarburos y los enzimas bacterianos. Nutrientes bacterianos tales como el nitrógeno y el fósforo pueden ser limitantes e inhibir el crecimiento.
15. **(a)** M_r 136; ácido fenilacético **(b)** Par
16. Debido a que el fondo mitocondrial de CoA es pequeño, el CoA ha de reciclarse desde el acetil-CoA vía formación de cuerpos cetónicos. Esto permite la operación de la ruta de la β oxidación, necesaria para la producción de energía.
17. **(a)** La glucosa forma piruvato vía glucólisis y el piruvato es la fuente principal de oxalacetato. Sin glucosa en la dieta, la [oxalacetato] disminuye y el ciclo del ácido cítrico se hace más lento. **(b)** Número impar; la conversión del propionato en succinil-CoA proporciona intermediarios del ciclo del ácido cítrico y precursores de cuatro carbonos para la gluconeogénesis.
18. Para el ácido heptanoico de cadena impar, la β-oxidación produce propionil-CoA, que se puede convertir en varios pasos en oxalacetato, un material de partida de la gluconeogénesis. El ácido graso de cadena par no puede dar lugar a gluconeogénesis ya que se oxida completamente a acetil-CoA.
19. La β-oxidación del ω-fluorooleato forma fluoroacetil-CoA, que entra en el ciclo del ácido cítrico y forma fluorocitrato, un potente inhibidor de la aconitasa. La inhibición de la aconitasa detiene el ciclo del ácido cítrico. Sin equivalentes de reducción del ciclo del ácido cítrico, la fosforilación oxidativa (síntesis de ATP) se detiene fatalmente.
20. Ser a Ala: bloquea la β-oxidación en la mitocondria. Ser a Asp: bloquea la síntesis de ácidos grasos, estimula la β-oxidación.
21. Se prolongaría la respuesta al glucagón o a la adrenalina, lo que daría una mayor movilización de ácidos grasos en los adipocitos.
22. Al tener Enz-FAD un potencial de reducción estándar más positivo, es mejor aceptor electrónico que el NAD^+ y la reacción está impulsada en la dirección de la oxidación del acil graso-CoA. Este equilibrio más favorable se obtiene a costa de 1 ATP; sólo se producen 1,5 ATP por $FADH_2$ oxidado en la cadena respiratoria (frente a 2,5 por NADH).
23. 9 vueltas; el ácido araquídico, un ácido graso saturado de 20 carbonos, produce 10 moléculas de acetil-CoA (las dos últimas en la vuelta 9).

24. Véase la Fig. 17–11. Se forma [3-^{14}C]succinil-CoA que da lugar a oxalacetato marcado en C-2 y C-3.

25. Ácido fitánico → ácido pristánico → propionil-CoA → → → succinil-CoA → succinato → fumarato → malato. Todos los carbonos del malato estarían marcados, pero C-1 y C-4 sólo tendrían como máximo la mitad de la marca que C-2 y C-3.

26. La hidrólisis de ATP en las reacciones que requieren energía en una célula capta agua en la reacción ATP + H_2O → ADP + P_i; así, en el estado estacionario no hay producción *neta* de H_2O.

27. La metilmalonil-CoA mutasa requiere el cofactor que contiene cobalto formado a partir de la vitamina B_{12}.

28. La masa perdida por día es de unos 0,66 kg o unos 140 kg en 7 meses. La cetosis podría evitarse mediante degradación de proteínas corporales no esenciales que suministraría esqueletos aminoácidos para la gluconeogénesis.

29. **(a)** Los ácidos grasos se convierten en sus derivados CoA por enzimas del citoplasma; los acil-CoA se importan a continuación a la mitocondria para su oxidación. Dado que los investigadores utilizaban mitocondrias aisladas tuvieron que utilizar derivados CoA. **(b)** El estearil-CoA se convirtió rápidamente en 9 acetil-CoA por la ruta de la β-oxidación. Todos los intermediarios reaccionaron rápidamente y ninguno fue detectable en cantidades significativas. **(c)** Dos vueltas. Cada vuelta elimina dos átomos de carbono, por lo que dos vueltas convierten un ácido graso de 18 carbonos en uno de 14 carbonos y 2 acetil-CoA. **(d)** La K_m es mayor para el isómero *trans* que para el *cis*, por lo que se requiere una concentración mayor de isómero *trans* para la misma velocidad de degradación. En términos aproximados el isómero *trans* no se une tan bien como el isómero *cis* debido probablemente a diferencias en forma, aunque no en el sitio diana, lo que afecta a la unión del sustrato. **(e)** El sustrato de la LCAD/VLCAD se acumula de forma diferente, según el sustrato concreto; es de esperar en el paso limitante de velocidad de la ruta. **(f)** Los parámetros cinéticos muestran que el isómero *trans* es peor sustrato que el isómero *cis* para la LCAD, pero hay poca diferencia para la VLCAD. Dado que es peor sustrato, el isómero *trans* se acumula en mayor grado que el *cis*. **(g)** Una ruta posible es la que se muestra a continuación (en la que indica "interior" y "exterior" de la mitocondria).

Elaidil-CoA (exterior) —carnitina aciltransferasa I→ elaidil-carnitina (exterior) —transporte→

elaidil-carnitina (interior) —carnitina aciltransferasa II→ elaidil-CoA (interior) —2 vueltas de β-oxidación→

5-*trans*-tetradecenoil-CoA (interior) —tioesterasa→ ácido 5-*trans*-tetradecanoico (interior) —difusión→

ácido 5-*trans*-tetradecanoico (exterior)

(h) Es correcto en tanto en cuanto las grasas trans se degradan menos eficientemente que las grasas cis por lo que las grasas trans pueden "gotear" de la mitocondria. Es incorrecto decir que las grasas trans no son degradadas por las células; se degradan pero a una velocidad menor que las grasas *cis*.

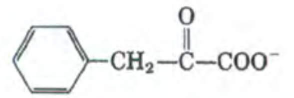
Capítulo18

1.

(a) $^{-}OOC{-}CH_2{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}COO^{-}$ **Oxalacetato**

(b) $^{-}OOC{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}COO^{-}$ **α-Cetoglutarato**

(c) $CH_3{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}COO^{-}$ **Piruvato**

(d)  **Fenilpiruvato**

2. Es un ensayo de reacción acoplada. El producto de la transaminación lenta (piruvato) se consume rápidamente en la siguiente "reacción indicadora" catalizada por la lactato deshidrogenasa que consume NADH. Así, la velocidad de desaparición del NADH es una medida de la velocidad de la reacción de la aminotransferasa. La reacción indicadora se sigue observando la disminución de absorbancia del NADH a 340 nm con un espectrofotómetro.

3. Alanina y glutamina juegan papeles especiales en el transporte de grupos amino desde el músculo y otros tejidos no hepáticos, respectivamente, hasta el hígado.

4. No; el nitrógeno de la alanina puede transferirse al oxalacetato vía transaminación formando aspartato.

5. 15 moles de ATP por mol de lactato; 13 moles de ATP por mol de alanina cuando se incluye la eliminación del nitrógeno.

6. **(a)** El ayuno dio lugar a una glucosa sanguínea baja; la administración posterior de la dieta experimental condujo a un rápido catabolismo de los aminoácidos glucogénicos. **(b)** La desaminación oxidativa aumentó los niveles de NH_3; la ausencia de arginina (un intermediario del ciclo de la urea) impidió la conversión del NH_3 en urea; la arginina no se sintetiza lo suficiente en el gato para soportar las necesidades impuestas por el estrés del experimento. Esto sugiere que la arginina es un aminoácido esencial en la dieta del gato. **(c)** La ornitina se convierte en arginina en el ciclo de la urea.

7. H_2O + glutamato + NAD^+ → α-cetoglutarato + NH_4^+ + NADH + H^+
NH_4^+ + 2ATP + H_2O + CO_2 → carbamil fosfato + 2ADP + P_i + $3H^+$
Carbamil fosfato + ornitina → citrulina + P_i + H^+
Citrulina + aspartato + ATP → argininosuccinato + AMP + PP_i + H^+
Argininosuccinato → arginina + fumarato
Fumarato + H_2O → malato
Malato + NAD^+ → oxalacetato + NADH + H^+
Oxalacetato + glutamato → aspartato + α-cetoglutarato
Arginina + H_2O → urea + ornitina

2 Glutamato + CO_2 + $4H_2O$ + $2NAD^+$ + 3ATP →
2 α-cetoglutarato + 2NADH + $7H^+$ + urea + 2ADP + AMP + PP_i $2P_i$ (1)

Reacciones adicionales que hay que considerar aquí son:
AMP + ATP → 2ADP (2)
O_2 + $8H^+$ + 2NADH + 6ADP + $6P_i$ → $2NAD^+$ + 6ATP + $8H_2O$ (3)
H_2O + PP_i → $2P_i$ + H^+ (4)

Sumando las ecuaciones (1) a (4),

2 Glutamato + CO_2 + O_2 + 2ADP + $2P_i$ →
2 α-cetoglutarato + urea + $3H_2O$ + 2ATP

8. El segundo grupo amino introducido en la urea se transfiere desde el aspartato que se genera durante la transaminación de glutamato a oxalacetato, una reacción que está catalizada por la aspartato aminotransferasa. Aproximadamente la mitad de todos los grupos amino excretados en forma de urea deben pasar forzosamente a través de la reacción de la aspartato aminotransferasa, lo que hace que ésta sea la aminotransferasa más activa.

9. **(a)** Una persona que sigue una dieta consistente sólo en proteína ha de utilizar aminoácidos como fuente principal de combustible metabólico. Debido a que el catabolismo de los aminoácidos requiere la eliminación de nitrógeno en forma de urea, el proceso consume cantidades anormalmente elevadas de agua para diluir y excretar la urea por la orina. Además, los electrolitos que se encuentran en la "proteína líquida" se han de diluir con agua y excretar. Si no se compensa la pérdida diaria de agua a través del riñón con una ingestión suficiente de agua, se produce una pérdida neta de agua corporal. **(b)** Cuando se consideran los beneficios nutritivos de la proteína, se ha de tener en cuenta la cantidad total de aminoácidos necesarios para la síntesis proteica y la distribución de aminoácidos en la proteína de la dieta. La gelatina contiene una distribución de aminoácidos nutricionalmente desequilibrada. Cuando se ingieren grandes cantidades de ge-

latina y se cataboliza el exceso de aminoácidos, puede excederse la capacidad del ciclo de la urea, lo que lleva a toxicidad por amoníaco. Se complica aún más por la deshidratación que se puede producir por la excreción de grandes cantidades de urea. La combinación de estos dos factores puede producir coma y muerte.

10. Lisina y leucina

11. **(a)** Fenilalanina hidroxilasa; una dieta baja en fenilalanina. **(b)** La ruta normal del metabolismo de la fenilalanina vía hidroxilación a tirosina está bloqueada y se acumula fenilalanina. **(c)** La fenilalanina se transforma en fenilpiruvato por transaminación y, seguidamente, en fenil-lactato por reducción. La reacción de transaminación tiene una constante de equilibrio de 1,0 y se forma fenilpiruvato en cantidades significativas cuando se acumula fenilalanina. **(d)** Ocurre por la deficiencia en la producción de tirosina, un precursor de la melanina, el pigmento presente en el pelo.

12. El catabolismo de los esqueletos carbonados de valina, metionina e isoleucina está dañado debido a la ausencia de metilmalonil-CoA mutasa funcional (un enzima con el coenzima B_{12}). Los efectos fisiológicos de la pérdida de este enzima se describen tanto en la Tabla 18–2 como en el Recuadro 18–2.

13. La dieta vegetariana estricta carece de vitamina B_{12}, lo que lleva a un incremento de homocisteína y de metilmalonato (reflejo de la carencia de metionina sintasa y ácido metilmalónico mutasa, respectivamente) en individuos que siguen la dieta desde hace varios años. Los productos lácteos proporcionan cierta cantidad de vitamina B_{12} en la dieta lactovegetariana.

14. Las formas genéticas de la anemia perniciosa aparecen generalmente como resultado de defectos en la ruta que facilita la absorción de la vitamina B_{12} de la dieta (véase el Recuadro 17–2, p. 658). Debido a que los suplementos dietéticos no son absorbidos en el intestino, estas enfermedades se tratan inyectando B_{12} suplementaria directamente en el torrente circulatorio.

15. El mecanismo es idéntico al de la serina deshidratasa (véase la Fig. 18–20a, p. 693) excepto que en este caso se retiene el grupo metilo adicional de la treonina, dando α-cetobutirato en lugar de piruvato.

16. **(a)** $^{15}NH_2{-}CO{-}^{15}NH_2$

(b) $^{-}OO^{14}C{-}CH_2{-}CH_2{-}^{14}COO^{-}$

(c) $R{-}NH{-}C({=}^{15}NH){-}^{15}NH_2$

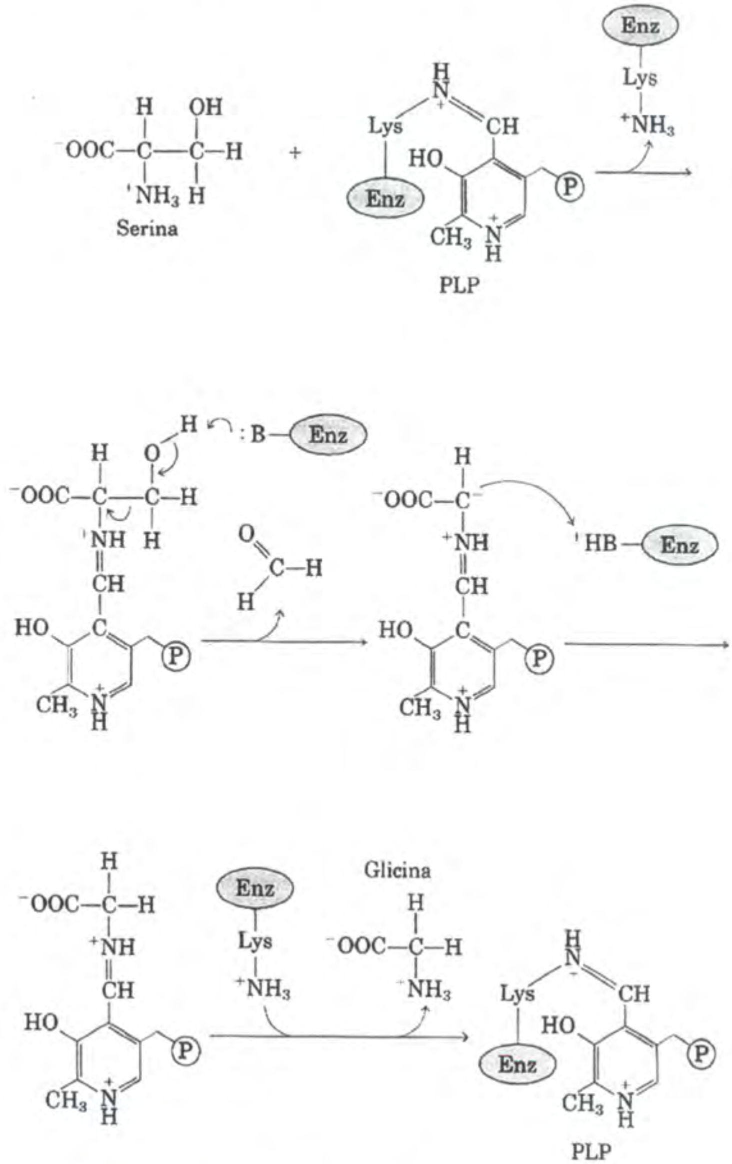
(d) $R{-}NH{-}C({=}O){-}^{15}NH_2$

(e) Sin marca

(f) $^{-}OO^{14}C{-}CH(^{15}NH_2){-}CH_2{-}^{14}COO^{-}$

17. **(a)** Isoleucina ①⟶ II ②⟶ IV ③⟶ I ④⟶ V ⑤⟶ III ⑥⟶ acetil-CoA + propionil-CoA **(b)** Paso ① transaminación, sin reacción análoga, PLP; ② descarboxilación oxidativa, análoga a la reacción de la piruvato deshidrogenasa, NAD^+, TPP, lipoato, FAD; ③ oxidación, análoga a la reacción de la succinato deshidrogenasa, FAD; ④ hidratación, análoga a la reacción de la fumarasa, no se requiere cofactor; ⑤ oxidación, análoga a la reacción de la malato deshidrogenasa, NAD^+; ⑥ tiólisis (inverso de una condensación aldólica), análoga a la reacción de la tiolasa, CoA.

18. Un mecanismo probable es:



El formaldehído (HCHO) producido en el segundo paso reacciona rápidamente con el tetrahidrofolato del sitio activo del enzima para producir N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato (véase la Fig. 18–17).

19. **(a)** Transaminación; no existen analogías en ninguna de las rutas; PLP. **(b)** Descarboxilación oxidativa; análoga a la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA antes de entrar en el ciclo del ácido cítrico y del α-cetoglutarato a succinil-CoA en el ciclo del ácido cítrico; NAD^+, FAD, lipoato y TPP. **(c)** Deshidrogenación (oxidación); análoga a la deshidrogenación del succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico y del acil graso–CoA a enoil-CoA en la β-oxidación; FAD. **(d)** Carboxilación; no existe reacción análoga en el ciclo del ácido cítrico o en la β-oxidación; ATP y biotina. **(e)** Hidratación; análoga a la hidratación del fumarato a malato en el ciclo del ácido cítrico y del enoil-CoA a 3-hidroxiacil-CoA en la β-oxidación; sin cofactores. **(f)** Reacción aldol inversa; análoga a la inversa de la reacción de la citrato sintasa del ciclo del ácido cítrico; sin cofactores.

20. **(a)** Leucina; valina; isoleucina **(b)** Cisteína (procedente de cistina). Si se descarboxilase la cisteína tal como se muestra en la Fig. 18-6, daría $H_3N^+{-}CH_2{-}CH_2{-}SH$, que se oxidaría a taurina. **(c)** La sangre de enero de 1957 tiene concentraciones significativamente elevadas de isoleucina, leucina, metionina y valina; la orina de enero de 1957 tiene isoleucina, leucina, taurina y valina significativamente elevadas. **(d)** Todos los pacientes tenían concentraciones elevadas de isoleucina, leucina

y valina tanto en sangre como en orina, lo que sugiere un defecto en la degradación de estos aminoácidos. Dado que la orina también contenía niveles elevados de las formas ceto de estos tres aminoácidos, el bloqueo de la ruta ha de tener lugar después de la desaminación pero antes de la deshidrogenación (tal como se muestra en la Fig. 18–28). **(e)** El modelo no explica las elevadas concentraciones de metionina en sangre y de taurina en orina. Los altos niveles de taurina pueden ser debidos a la muerte de células cerebrales durante la fase final de la enfermedad. Sin embargo, no está clara la razón sobre los elevados niveles de metionina en sangre; la ruta de degradación de la metionina no está unida con la de degradación de los aminoácidos ramificados. El aumento de la metionina podría ser un efecto secundario de la acumulación de aminoácidos. Es importante tener en cuenta que las muestras de enero de 1957 eran de un individuo que se estaba muriendo, por lo que comparar resultados de sangre y orina con los de individuos sanos puede no ser adecuado. **(f)** Es necesaria la siguiente información (que fue finalmente proporcionada por otros investigadores): (1) la actividad deshidrogenasa está reducida de manera significativa o no existe en individuos con la enfermedad del jarabe de arce en la orina. (2) La enfermedad se hereda como defecto en un único gen. (3) El defecto tiene lugar en un gen que codifica toda la deshidrogenasa o parte de ella. (4) El defecto genético produce un enzima inactivo.

Capítulo 19

1. *Reacción (1):* (a), (d) NADH; (b), (e) E-FMN; (c) NAD^+/NADH y E-FMN/$FMNH_2$
Reacción (2): (a), (d) E-$FMNH_2$; (b), (e) Fe^{3+}; (c) E-FMN/$FMNH_2$ y Fe^{3+}/Fe^{2+}
Reacción (3): (a), (d) Fe^{2+}; (b), (e) Q; (c) Fe^{3+}/Fe^{2+} y Q/QH_2

2. La cadena lateral hace que la ubiquinona sea soluble en lípidos y le permite difundir en la membrana semifluida.

3. De la diferencia en potencial de reducción estándar ($\Delta E'^{\circ}$) para cada par de semirreacciones se puede calcular $\Delta G'^{\circ}$. La oxidación del succinato por el FAD está favorecida por la variacion negativa de energía libre estándar ($\Delta G'^{\circ} = -3,7$ kJ/mol). La oxidación por el NAD^+ requeriría una variación de energía libre estándar grande y positiva ($\Delta G'^{\circ} = 68$ kJ/mol).

4. **(a)** Todos los transportadores reducidos; el CN^- bloquea la reducción del O_2 catalizada por la citocromo oxidasa. **(b)** Todos los transportadores reducidos; en ausencia de O_2 los transportadores reducidos no se reoxidan. **(c)** Todos los transportadores oxidados. **(d)** Los transportadores más hacia el inicio están más reducidos; los transportadores posteriores más oxidados.

5. **(a)** La inhibición de la NADH deshidrogenasa por la rotenona disminuye la velocidad del flujo electrónico a través de la cadena respiratoria, la cual a su vez disminuye la velocidad de producción de ATP. Si esta velocidad disminuida es incapaz de satisfacer las necesidades de ATP del organismo, éste muere. **(b)** La antimicina A inhibe fuertemente la oxidación de Q en la cadena respiratoria, reduciendo la velocidad de transferencia electrónica y llevando a las consecuencias descritas en (a). **(c)** Dado que la antimicina A bloquea *todo* el flujo electrónico al oxígeno, es un veneno más potente que la rotenona, la cual bloquea el flujo electrónico desde el NADH pero no desde el $FADH_2$.

6. **(a)** La velocidad de transferencia electrónica necesaria para satisfacer la demanda de ATP aumenta y así la razón P/O disminuye. **(b)** Altas concentraciones del agente desacoplante produce razones P/O próximas a cero. La razón P/O disminuye, por lo que se ha de oxidar más combustible para generar la misma cantidad de ATP. El calor extra liberado por esta oxidación aumenta la temperatura corporal. **(c)** El aumento en la actividad de la cadena respiratoria en presencia de un desacoplante requiere la degradación de más combustible. Al oxidar más combustible (incluidas las reservas de grasa) para producir la misma cantidad de ATP, el cuerpo pierde peso. Cuando la razón P/O se acerca a cero, la falta de ATP produce la muerte.

7. La valinomicina actúa como un desacoplante. Se combina con K^+ para formar un complejo que pasa a través de la membrana mitocondrial interna, disipando el potencial de membrana. La síntesis de ATP disminuye, lo que hace aumentar la velocidad de transferencia electrónica. Esto produce un aumento en el gradiente de H^+, en el consumo de O_2 y en la cantidad de calor liberado.

8. **(a)** La formación de ATP está inhibida. **(b)** La formación de ATP está acoplada a la transferencia de electrones: el 2,4-dinitrofenol es un desacoplante de la fosforilación oxidativa. **(c)** Oligomicina

9. La malato deshidrogenasa citosólica juega un papel clave en el transporte de equivalentes de reducción a través de la membrana mitocondrial interna vía lanzadera del malato-aspartato.

10. **(a)** La glucólisis se volverá anaeróbica. **(b)** Cesará el consumo de oxígeno. **(c)** Aumentará la formación de lactato. **(d)** La síntesis de ATP disminuirá a 2ATP/glucosa.

11. La concentración de estado estacionario del P_i en la célula es mucho más elevada que la del ADP. El P_i liberado en la hidrólisis del ATP cambia muy poco la $[P_i]$ total.

12. La respuesta a (a), aumento de [ADP], es más rápida porque la respuesta a (b), reducción en pO_2, requiere síntesis proteica.

13. **(a)** El NADH se reoxida vía transferencia electrónica en lugar de la fermentación del ácido láctico. **(b)** La fosforilación oxidativa es más eficiente. **(c)** La elevada razón de acción de masas del sistema del ATP inhibe la fosfofructoquinasa-1.

14. La fermentación a etanol se podría llevar a cabo en presencia de O_2, una ventaja dado que las condiciones anaeróbicas estrictas son difíciles de mantener. No se observa el efecto Pasteur porque el ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte electrónico son inactivos.

15. Transferencia electrónica más eficiente entre los complejos.

16. **(a)** Medio exterior: $4,0 \times 10^{-8}$ M; matriz: $2,0 \times 10^{-8}$ M **(b)** El gradiente de $[H^+]$ contribuye con 1,7 kJ/mol hacia la síntesis de ATP **(c)** 21 **(d)** No **(e)** A partir del potencial transmembrana global.

17. **(a)** 0,91 μmol/s·g **(b)** 5,5 s; para proporcionar un nivel constante de ATP, la regulación de la producción debe ser estricta y rápida.

18. 53 μmol/s·g. Con una [ATP] en el estado estacionario de 7,0 μmol/g, esto es equivalente a 10 recambios del fondo (pool) de ATP por segundo; las reservas durarían unos 0,13 s.

19. Las especies reactivas de oxígeno reaccionan con macromoléculas como el DNA. Si un defecto mitocondrial conduce a un incremento en la producción de ROS, los genes nucleares que codifican los protooncogenes (pp. 473, 474) pueden quedar dañados; se producen oncogenes, se desregula la división celular y se produce cáncer.

20. Grados diferentes de heteroplasmia del gen defectuoso producen grados diferentes de función mitocondrial defectuosa.

21. La membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH pero los equivalentes de reducción del NADH se transfieren (lanzadera) indirectamente a través de la membrana: se transfieren al oxalacetato en el citosol, el malato resultante se transporta a la matriz y el NAD^+ mitocondrial se reduce a NADH.

22. El ciclo del ácido cítrico se detiene por falta de un aceptor de los electrones del NADH. El piruvato producido en la glucólisis no puede entrar en el ciclo en forma de acetil-CoA; el piruvato acumulado se transamina a alanina y se exporta al hígado.

23. La piruvato deshidrogenasa está localizada en la mitocondria la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en el citosol. Los fondos de NAD están separados por la membrana mitocondrial interna.

24. La falta completa de glucoquinasa; dos alelos defectuosos hace que sea imposible llevar a cabo la glucólisis a una velocidad suficiente para aumentar la [ATP] hasta el umbral necesario para la secreción de insulina.

25. Defectos en el Complejo II dan como resultado un incremento en la producción de ROS, daños en el DNA y mutaciones que conducen a una división celular desregulada (cáncer). No está claro por qué el cáncer tiende a localizarse en el intestino medio.

26. Para la máxima velocidad fotosintética, PSI (que absorbe luz de 700 nm) y PSII (que absorbe luz de 680 nm) han de operar de forma simultánea.

27. El peso extra procede del agua consumida en la reacción global.

28. Las bacterias púrpura del azufre usan H_2S como dador de hidrógeno en la fotosíntesis. No se libera O_2 porque el único fotosistema presente carece del complejo rompedor del agua que contiene manganeso.

29. 0,44

30. **(a)** Se detiene **(b)** Se hace más lento; una parte del flujo electrónico continúa a través de la ruta cíclica.

31. Durante la iluminación se establece un gradiente de protones. Al añadir ADP y P_i la síntesis de ATP es impulsada por el gradiente, el cual se agota en ausencia de la luz.

32. La DCMU bloquea la transferencia de electrones entre PSII y el primer sitio de producción de ATP.

33. En presencia de venturicidina, el movimiento de protones a través del complejo CF_oCF_1 está bloqueado y el flujo electrónico (liberación de oxígeno) sigue sólo hasta que el coste en energía libre de bombear protones contra el gradiente de protones creciente se iguala con la energía libre disponible en un fotón. El DNP disipa el gradiente de protones y restaura el flujo electrónico y la liberación de oxígeno.

34. **(a)** 56 kJ/mol **(b)** 0,29 V

35. A partir de la diferencia de los potenciales de reducción se puede calcular que $\Delta G'^{\circ} = 15$ kJ para la reacción redox. De la Fig. 19–46 es evidente que la energía de los fotones en cualquier región del espectro visible basta para impulsar esta reacción endergónica.

36. $1,35 \times 10^{-77}$; ¡la reacción es altamente desfavorable! En los cloroplastos la captación de energía luminosa supera esta barrera.

37. –920 kJ/mol

38. No; los electrones del agua fluyen hacia el aceptor electrónico artificial Fe^{3+}: no al $NADP^+$.

39. Aproximadamente una vez cada 0,1 s; 1 en 10^8 está excitado.

40. La luz de 700 nm excita PSI pero no PSII; los electrones fluyen desde el P700 al $NADP^+$ pero no fluyen electrones desde el P680 para reemplazarlos. Cuando la luz de 680 nm excita PSII los electrones tienden a fluir hacia el PSI, pero los transportadores electrónicos entre los dos fotosistemas rápidamente quedan totalmente reducidos.

41. No. El electrón excitado del P700 vuelve a rellenar el "hueco" creado por la iluminación. El PSII no es necesario para suministrar electrones y no se libera O_2 a partir del H_2O. No se forma NADPH porque el electrón excitado vuelve a P700.

42. **(a)** (1) La presencia de Mg^{2+} apoya la hipótesis de que la clorofila interviene directamente en la catálisis de la reacción de fosforilación: ADP + $P_i \rightarrow$ ATP. (2) Muchos enzimas (u otras proteínas) que contienen Mg^{2+} no son enzimas fosforilantes, por lo que la presencia de Mg^{2+} en la clorofila no prueba que tenga un papel en las reacciones de fosforilación. (3) La presencia de Mg^{2+} es esencial para las propiedades fotoquímicas de la clorofila: absorción de la luz y transferencia electrónica. **(b)** (1) Los enzimas catalizan reacciones reversibles, por lo que un enzima aislado que puede en ciertas condiciones de laboratorio catalizar la eliminación de un grupo fosforilo podría probablemente, bajo ciertas condiciones (tales como las que se dan en las células) catalizar la adición de un grupo fosforilo. Por tanto, es plausible que la clorofila pudiese intervenir en la fosforilación del ADP. (2) Hay dos explicaciones posibles: la proteína clorofilada es sólo una fosfatasa y no cataliza la fosforilación del ADP en las condiciones celulares o la preparación cruda contiene una actividad fosfatasa contaminante que no está conectada con las reacciones fotosintéticas. (3) Es probable que la preparación estuviese contaminada con una actividad fosfatasa no fotosintética. **(c)** (1) Esta inhibición por la luz es lo que se podría esperar si la proteína con clorofila catalizase la reacción ADP + P_i + luz $\rightarrow$ ATP. Sin luz, la reacción inversa, una desfosforilación, estaría favorecida. En presencia de luz hay energía y el equilibrio se desplazaría a la derecha, reduciendo la actividad fosfatasa. (2) Esta inhibición debe ser un artefacto del aislamiento o del método de ensayo. (3) Es improbable que los métodos con la preparación cruda en uso en aquel tiempo preservase intactas las membranas de los cloroplastos por lo que la inhibición ha de ser un artefacto. **(d)** (1) En presencia de luz, se sintetiza ATP y se consumen otros intermediarios fosforilados. (2) En presencia de luz, se produce glucosa que es metabolizada por la respiración celular para producir ATP, con cambios en las concentraciones de intermediarios fosforilados. (3) En presencia de luz, se produce ATP mientras que se consumen otros intermediarios fosforilados. **(e)** La energía luminosa se utiliza para producir ATP (como en el modelo de Emerson) *y* se utiliza para producir poder reductor (según el modelo de Rabinowitch). **(f)** La estequiometría aproximada de la fotofosforilación (Capítulo 19) es que 8 fotones dan lugar a 2 NADPH y unos 3 ATP. Se requieren dos NADPH y 3 ATP para reducir una molécula de CO_2 (Capítulo 20). Esto está bastante de acuerdo con el valor de Rabinowitch. **(g)** Dado que la energía luminosa se utiliza para producir *tanto* ATP *como* NADPH, la contribución a la fotosíntesis de cada fotón es superior a 1 ATP. El proceso de extracción de energía a partir de la luz es más eficiente de lo que supuso Rabinowitch, con lo que hay abundante energía disponible para este proceso, incluso con la luz roja.

Capítulo 20

1. Dentro de los orgánulos subcelulares, las concentraciones de enzimas específicos y metabolitos son elevadas; se mantienen fondos separados de cofactores e intermediarios; los mecanismos reguladores sólo afectan a un conjunto de enzimas y fondos (pools).

2. Esta observación sugiere que el ATP y el NADPH se generan en la luz y que son esenciales para la fijación de CO_2; la conversión se detiene a medida que se agota el suministro de ATP y NADPH. Además, algunos enzimas se inhiben en la oscuridad.

3. X es el 3-fosfoglicerato; Y es la ribulosa 1,5-bisfosfato.

4. Ribulosa 5-fosfato quinasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; todos ellos se activan por reducción de un enlace disulfuro específico a dos sulfhidrilos; el yodoacetato reacciona de forma irreversible con los sulfhidrilos libres.

5. Para llevar a cabo la reacción de intercambio de sulfhidrilos que activa los enzimas del ciclo de Calvin, la tiorredoxina necesita sus dos grupos sulfhidrilo.

6. La ruta reductora de las pentosas fosfato regenera ribulosa 1,5-bisfosfato a partir de triosas fosfato producidas durante la fotosíntesis. La ruta oxidativa de las pentosas fosfato da NADPH para la biosíntesis reductora y pentosas fosfato para la síntesis de nucleótidos.

7. Los dos tipos de "respiración" tienen lugar en las plantas, consumen O_2 y producen CO_2.(La respiración mitocondrial también tiene lugar en los animales.) La respiración mitocondrial tiene lugar de forma continua; electrones procedentes de diversos combustibles pasan a través de una cadena de transportadores de la membrana mitocondrial interna hasta el O_2. La fotorrespiración tiene lugar en cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias. La fotorrespiración tiene lugar durante el día, momento en que se produce la fijación fotosintética de carbono; la respiración mitocondrial se da principalmente durante la noche o durante días nubosos. En la Figura 20–21 se muestra la ruta de los electrones en la fotorrespiración; la de la respiración mitocondrial se muestra en la Fig. 19–16.

8. Esta hipótesis considera la evolución dirigida, o la evolución con un propósito, ideas que no están generalmente aceptadas por los biólogos de la evolución. Otros procesos, tales como la combustión de combustibles fósiles y la desforestación global, afectan la composición atmosférica global. Las plantas C_4, al fijar CO_2 en condiciones en las que la rubisco prefiere O_2 como sustrato, también contribuyen a fijar las razones CO_2/O_2 atmosféricas.

9. **(a)** Sin la producción de NADPH por la ruta de las pentosas fosfato, las células serían incapaces de sintetizar lípidos y otros productos reducidos. **(b)** Sin la generación de ribulosa 1,5-bisfosfato, el ciclo de Calvin estaría bloqueado de manera efectiva.

10. En el maíz, el CO_2 se fija mediante la ruta C_4 descubierta por Hatch y Slack, en la que el PEP se carboxila rápidamente a oxalacetato (parte del cual se transamina a aspartato) y se reduce a malato. Sólo después de la descarboxilación posterior el CO_2 entra en el ciclo de Calvin.

11. Mide la velocidad de fijación de ^{14}C dióxido de carbono en la luz (durante el día) y en la oscuridad. La planta CAM se identifica por una mayor fijación en la oscuridad. También se puede determinar la acidez neutralizable; de esta manera se pueden cuantificar los ácidos almacenados en la vacuola durante la noche.

12. La reacción de la isocitrato deshidrogenasa

13. El almacenamiento consume 1 mol de ATP por mol de glucosa 6-fosfato; esto representa el 3,3% del ATP total disponible para el metabolismo de la glucosa 6-fosfato (es decir, la eficiencia del almacenamiento es del 96,7%).

14. La $[PP_i]$ es alta en el citosol porque éste no contiene pirofosfato inorgánico hidrolasa.

15. (a) Baja $[P_i]$ en el citosol y elevada [triosa fosfato] en el cloroplasto **(b)** Elevada [triosa fosfato] en el citosol.

16. El 3-fosfoglicerato es el producto principal de la fotosíntesis; la $[P_i]$ aumenta cuando la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i impulsada por la luz se hace más lenta.

17. (a) Sacarosa + $(\text{glucosa})_n \rightarrow (\text{glucosa})_{n+1}$ + fructosa **(b)** La fructosa generada en la síntesis de dextrano es fácilmente importada y metabolizada por la bacteria.

18. La especie 1 es C4; la especie 2, C3.

19. (a) En los cloroplastos periféricos; tanto para **(b)** como para **(c)** en la esfera central

20. (a) Por analogía con la fotosíntesis oxigénica realizada por las plantas ($H_2O + CO_2 \rightarrow$ glucosa + O_2), la reacción sería $H_2S + O_2 + CO_2 \rightarrow$ glucosa + S + H_2O. Esto es la suma de la reducción de CO_2 por H_2S ($H_2S + CO_2 \rightarrow$ glucosa + S) y el aporte de energía ($H_2S + O_2 \rightarrow S + H_2O$). **(b)** El H_2S y el CO_2 se producen químicamente en sedimentos marinos profundos, pero el O_2 como la gran mayoría de O_2 en la Tierra, se produce por fotosíntesis impulsada por la energía luminosa. **(c)** En el ensayo de Robinson et al., ^3H marca el C-1 de la ribulosa 1,5-bisfosfato, por lo que la reacción con CO_2 da una molécula de [^{3}H]3-fosfoglicerato y una de 3-fosfoglicerato sin marcar; la reacción con O_2 produce una molécula de [^{3}H]2-fosfoglicolato y una de 3-fosfoglicerato sin marcar. Así, la razón de [^{3}H]3-fosfoglicerato a [^{3}H]2-fosfoglicolato es igual a la razón de carboxilación a oxigenación. **(d)** Si el ^3H marcase el C-5, *tanto* la oxigenación *como* la carboxilación darían [^{3}H]3-fosfoglicerato y sería imposible distinguir qué reacción había producido el producto marcado; no servía para medir Ω.

(e) Sustituyendo $\dfrac{[CO_2]}{[O_2]} = \dfrac{0{,}00038}{0{,}2} = 0{,}0019$ en

$$\frac{V_{\text{carboxilación}}}{V_{\text{oxigenación}}} = \Omega\frac{[CO_2]}{[O_2]} \text{ da}$$

$$\frac{V_{\text{carboxilación}}}{V_{\text{oxigenación}}} = (8{,}6)(0{,}0019) = 0{,}016$$

Por tanto, la velocidad de oxigenación sería aproximadamente ¡60 veces la velocidad de carboxilación! **(f)** Si las plantas terrestres tuviesen Ω = 8,6, la carboxilación tendría lugar a una velocidad mucho menor que la oxigenación. Sería muy ineficiente, por lo que cabría esperar que la rubisco de las plantas terrestres tuviesen una Ω muy superior a 8,6. De hecho, los valores de Ω de las plantas terrestres varían entre 10 y 250. Aún con estos valores, la velocidad esperada de la reacción de oxigenación es aún muy elevada. **(g)** La reacción de la rubisco se produce con CO_2 gaseoso. A la misma temperatura, las moléculas de $^{13}CO_2$ difunden más lentamente que las más ligeras de $^{12}CO_2$, y así el $^{13}CO_2$ entra en el sitio activo (y se incorpora al sustrato) más lentamente que el $^{12}CO_2$. **(h)** Para que la relación sea verdaderamente simbiótica, los gusanos tubulares han de obtener una cantidad sustancial de su carbono de las bacterias. La presencia de rubisco en los endosimbiontes muestra simplemente que son capaces de quimiosíntesis, no que estén suministrando una fracción significativa de su carbono al huésped. Por otra parte la demostración que la razón ^{13}C:^{12}C en el huésped es más parecida a la del endosimbionte que a la de otros animales marinos sugiere que los gusanos tubulares obtienen la mayor parte de su carbono de las bacterias.

Capítulo 21

1. (a) Los 16 carbonos del palmitato proceden de los 8 grupos acetilo de 8 moléculas de acetil-CoA. El acetil-CoA marcado con ^{14}C da lugar a malonil-CoA marcado en C-1 y C-2. **(b)** El fondo metabólico de malonil-CoA, fuente de todos los carbonos del palmitato excepto C-16 y C-15, no resulta marcado con pequeñas cantidades de acetil-CoA marcado con ^{14}C. Este es el motivo por el cual sólo se forma palmitato [15,16-^{14}C].

2. Tanto la glucosa como la fructosa se degradan a piruvato en la glucólisis. El piruvato se convierte en acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa. Parte de este acetil-CoA entra en el ciclo del ácido cítrico, el cual produce equivalentes de reducción (NADH y NADPH). La transferencia electrónica mitocondrial al O_2 produce ATP.

3. 8 Acetil-CoA + 15 ATP + 14NADPH + $9H_2O \rightarrow$
palmitato + 8 CoA + 15ADP + $15P_i$ + $14NADP^+$ + $2H^+$

4. (a) 3 deuterios por palmitato; todos ellos localizados sobre el C-16; todas las demás unidades de dos carbonos proceden del malonil-CoA sin marcar. **(b)** 7 deuterios por palmitato; localizados en todos los carbonos de número *par* excepto el C-16.

5. Al utilizar la unidad de tres carbonos malonil-CoA, la forma activada del acetil-CoA (recuerde que la síntesis de malonil-CoA requiere ATP), se impulsa el metabolismo en la dirección de la síntesis de ácidos grasos por la liberación exergónica de CO_2.

6. La etapa limitante de velocidad en la síntesis de ácidos grasos es la carboxilación del acetil-CoA catalizada por la acetil-CoA carboxilasa. Altas [citrato] e [isocitrato] indican que las condiciones son favorables para la síntesis de ácidos grasos: un ciclo del ácido cítrico activo está proporcionando abundante suministro de ATP, nucleótidos de piridina reducidos y acetil-CoA. El citrato estimula (aumenta la V_{max} de) la acetil-CoA carboxilasa. **(a)** Debido a que el citrato se une más fuertemente a la forma filamentosa del enzima (forma activa), la elevada [citrato] impulsa el equilibrio protómero $\rightleftharpoons$ filamento en la dirección de la forma activa. **(b)** Por el contrario, el palmitil-CoA (producto final de la síntesis de ácidos grasos) impulsa el equilibrio en la dirección de la forma inactiva (protómero). De aquí que cuando se acumula el producto final de la síntesis de ácidos grasos, la ruta biosintética se hace más lenta.

7. (a) Acetil-$CoA_{(mit)}$ + ATP + $CoA_{(cit)} \rightarrow$ acetil-$CoA_{(cit)}$ +ADP + P_i + $CoA_{(mit)}$ **(b)** 1 ATP por grupo acetilo **(c)** Sí

8. El doble enlace en el palmitoleato es introducido por una oxidación catalizada por la acil graso-CoA desaturasa, una oxidasa de función mixta que requiere O_2 como cosustrato.

9. 3 Palmitato + glicerol + 7ATP + $4H_2O \rightarrow$
tripalmitina + 7ADP + $7P_i$ + $7H^+$

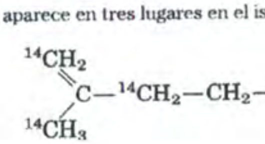
10. En las ratas adultas, los triacilgliceroles almacenados se mantienen a un nivel de estado estacionario a través de un equilibrio de las velocidades de degradación y biosíntesis. Por ello, los triacilgliceroles del tejido adiposo (grasa) se recambian constantemente, lo que explica la incorporación de la marca de ^{14}C de la glucosa de la dieta.

11. Reacción neta:

Dihidroxiacetona fosfato + NADH + palmitato + oleato + 3ATP + CTP + colina + $4H_2O \rightarrow$
fosfatidilcolina + NAD^+ + 2AMP + ADP + H^+ + CMP + $5P_i$
7 ATP por molécula de fosfatidilcolina

12. La deficiencia de metionina reduce el nivel de adoMet, necesaria para la síntesis de novo de fosfatidilcolina. La ruta de recuperación no utiliza adoMet, sino que utiliza la colina disponible. Así, se puede sintetizar fosfatidilcolina incluso cuando la dieta es deficitaria en metionina, siempre que haya colina disponible.

13. La marca con ^{14}C aparece en tres lugares en el isopreno activado:



14. **(a)** ATP **(b)** UDP-glucosa **(c)** CDP-etanolamina **(d)** UDP-galactosa **(e)** Acil graso-CoA **(f)** *S*-Adenosilmetionina **(g)** Malonil-CoA **(h)** Δ^3-Isopentenil pirofosfato

15. El linoleato es necesario en la síntesis de prostaglandinas. Los animales no pueden transformar el oleato en linoleato, por lo que el linoleato es un ácido graso esencial. Las plantas pueden transformar el oleato en linoleato y así proporcionan a los animales el linoleato requerido (véase la Fig. 21–12).

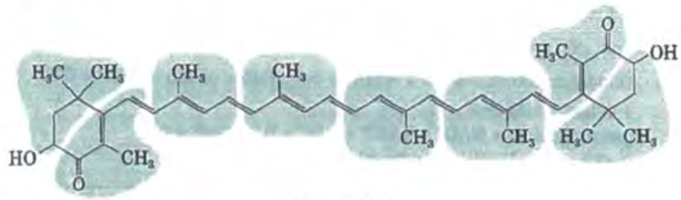
16. El paso limitante de velocidad en la biosíntesis del colesterol es la síntesis de mevalonato catalizada por la hidroximetilglutaril-CoA reductasa. Este enzima está regulado alostéricamente por el mevalonato y derivados del colesterol. Niveles elevados de colesterol intracelular también reducen la transcripción del gen que codifica la HMG-CoA reductasa.

17. Cuando disminuye la concentración de colesterol debido al tratamiento con estatina, las células intentan compensarlo aumentando la expresión del gen que codifica la HMG-CoA reductasa. No obstante, las estatinas son buenos inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa y reducen la producción global de colesterol.

18. Nota: Existen diversas alternativas plausibles que podría presentar un estudiante en ausencia de un conocimiento detallado de la bibliografía sobre este enzima. *Reacción de la tiolasa:* empieza con un ataque nucleofílico de un residuo Cys del sitio activo sobre el primer sustrato acetil-CoA, desplazando —S-CoA y formando un enlace covalente tioéster entre Cys y el grupo acetilo. A continuación una base del enzima extrae un protón del grupo metilo del segundo acetil-CoA dejando un carbanión que ataca el carbono carbonílico del tioéster formado en el primer paso. Se desplaza el sulfhidrilo del residuo Cys creando el producto acetoacetil-CoA. *Reacción de la HMG-CoA sintasa:* empieza de la misma manera, con la formación de un enlace covalente tioéster entre el residuo Cys del enzima y el grupo acetilo del acetil-CoA con desplazamiento del —S-CoA. El —S-CoA se disocia en forma de CoA-SH y el acetoacetil-CoA se une al enzima. Se extrae un protón del grupo metilo del acetilo ligado al enzima, formando un carbanión que ataca el carbonilo cetónico del sustrato acetoacetil-CoA. En esta reacción el carboxilo se transforma en un ión hidroxilo el cual se protona creando —OH. A continuación se rompe hidrolíticamente el enlace tioéster con el enzima generando el producto HMG-CoA. *Reacción de la HMG-CoA reductasa:* dos iones hidruro sucesivos procedentes del NADPH desplazan en primer lugar el —S-CoA y a continuación reducen el aldehído a grupo hidroxilo.

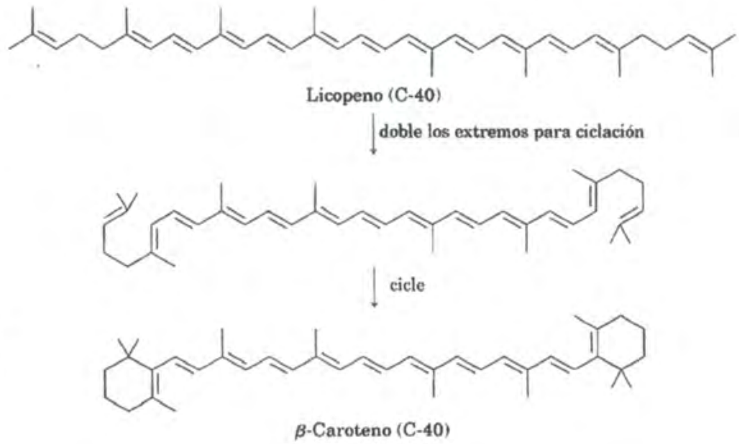
19. Las estatinas inhiben la HMG-CoA reductasa, un enzima de la ruta de síntesis de los isoprenos activados, precursores del colesterol y de una amplia gama de isoprenoides, entre ellos el coenzima Q (ubiquinona). De ahí que las estatinas puedan reducir los niveles de coenzima Q disponibles para la respiración mitocondrial. La ubiquinona se obtiene tanto de la dieta como por biosíntesis directa, pero no está aún claro cuánta se requiere y en qué medida la fuentes de la dieta pueden compensar la reducción de su síntesis. Reducciones en los niveles de isoprenoides concretos pueden justificar algunos efectos secundarios de las estatinas.

20. **(a)**



Astaxantina

(b) Cabeza-cabeza. Existen dos maneras de considerar esta cuestión. Primero, la "cola" del geranilgeranil pirofosfato tiene una estructura dimetilo ramificada, por lo que ambos extremos proceden del fitoeno. Segundo, no se forma ningún —OH libre por liberación de PP_i, lo que indica que las dos "cabezas" —O—Ⓟ—Ⓟ se unen para formar el fitoeno. **(c)** Cuatro ciclos de deshidrogenación convierten cuatro enlaces sencillos en dobles enlaces. **(d)** No. El contaje de los enlaces sencillos y dobles de la reacción siguiente muestra que un doble enlace es reemplazado por dos sencillos, por lo que no hay oxidación o reducción netas.



β-Caroteno (C-40)

(e) Pasos ① a ③. El enzima puede convertir IPP y DMAP en geranilgeranil pirofosfato, pero no cataliza más reacciones de la ruta, tal como se confirma por los resultados con otros sustratos. **(f)** Las cepas 1 a 4 carecen de *crtE* y tienen una producción de astaxantina mucho menor que las cepas 5 a 8, todas las cuales sobreexpresan *crtE*. Así, la sobreexpresión de *crtE* conduce a un aumento sustancial en la producción de astaxantina. *E. coli* de tipo salvaje tiene cierta actividad en el paso ③, pero su conversión de farnesil pirofosfato en geranilgeranil pirofosfato es altamente limitante de velocidad. **(g)** IPP isomerasa. La comparación entre las cepas 5 y 6 muestra que la adición de *ispA*, que cataliza, los pasos ① y ②, tiene poco efecto sobre la producción de astaxantina, por lo que estos pasos no son limitantes de velocidad. Pero una comparación entre las cepas 5 y 7 muestra que la adición de *idi* aumenta de manera sustancial la producción de astaxantina por lo que la IPP isomerasa ha de ser limitante de velocidad cuando se sobreexpresa *crtE*. **(h)** Un nivel bajo (+) comparable al de las cepas 5, 6 y 9. Sin sobreexpresión de *idi*, la producción de astaxantina está limitada por la baja actividad de la IPP isomerasa y el consiguiente suministro limitado de IPP.

Capítulo 22

1. En su relación simbiótica con la planta, las bacterias suministran ión amonio mediante reducción del nitrógeno atmosférico, lo que requiere grandes cantidades de ATP.

2. La transferencia de nitrógeno del NH_3 a los esqueletos carbonados puede ser catalizada por (1) glutamina sintetasa y (2) glutamato deshidrogenasa. Este segundo enzima produce glutamato, el dador del grupo amino en todas las reacciones de transaminación, necesarias en la formación de aminoácidos para la síntesis de proteínas.

3. Se forma primero un enlace entre el PLP unido al enzima y el sustrato fosfohomoserina, con reordenamiento que forma la cetimina en el carbono *α* del sustrato. Esto activa el carbono *β* para la captación de un protón, lo que conduce a un desplazamiento del fosfato y a la formación de un doble enlace entre los carbonos *β* y *γ*. Un reordenamiento (que empieza con la captación de un protón en el carbono del piridoxal adyacente al nitrógeno amino del sustrato) mueve el doble enlace entre los carbonos *α* y *β*, convirtiendo la forma cetimina del PLP en aldimina. El ataque del agua sobre el carbono *β* está facilitado por el piridoxal unido, seguido de hidrólisis del enlace imina entre el PLP y el producto para generar treonina.

4. Los iones amonio tóxicos se transforman en glutamina en la ruta de los mamíferos, reduciendo los efectos tóxicos sobre el cerebro.

5. Glucosa + $2CO_2$ + $2NH_3$ → 2 aspartato + $2H^+$ + $2H_2O$

6. El dominio amino-terminal de la glutaminasa es muy parecido en *todas* las glutamina amidotransferasas. Un medicamento que estuviese destinado a este sitio activo inhibiría probablemente muchos enzimas por lo que sería propenso a producir muchos más efectos secundarios

que un inhibidor más específico destinado al sitio activo carboxilo terminal de la sintetasa que es singular.

7. Si falta fenilalanina hidroxilasa, está bloqueada la ruta biosintética de la tirosina, por lo que ésta ha de ser obtenida de la dieta.

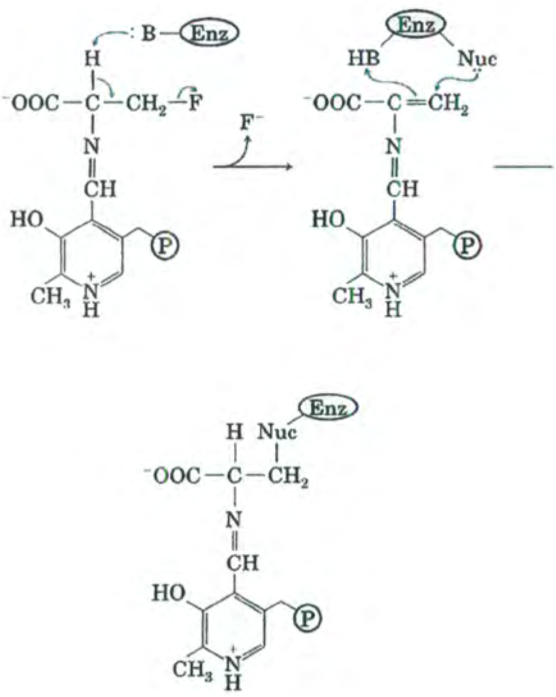
8. En la síntesis de adoMet se libera trifosfato del ATP. La hidrólisis del trifosfato hace que la reacción sea termodinámicamente más favorable.

9. Si la inhibición de la glutamina sintasa no estuviese concertada, concentraciones saturantes de histidina inactivarían el enzima y se pararía la producción de glutamina, necesaria para que la bacteria sintetice otros productos.

10. El ácido fólico es un precursor del tetrahidrofolato (Fig. 18–16), necesario para la biosíntesis de glicina (Fig. 22–12), un precursor de las porfirinas. Un déficit de ácido fólico impide, por tanto, la síntesis de hemoglobina.

11. *Para los auxótrofos de glicina:* adenina y guanina; *para los auxótrofos de glutamina:* adenina, guanina y citosina; *para los auxótrofos de aspartato:* adenina, guanina, citosina y uridina.

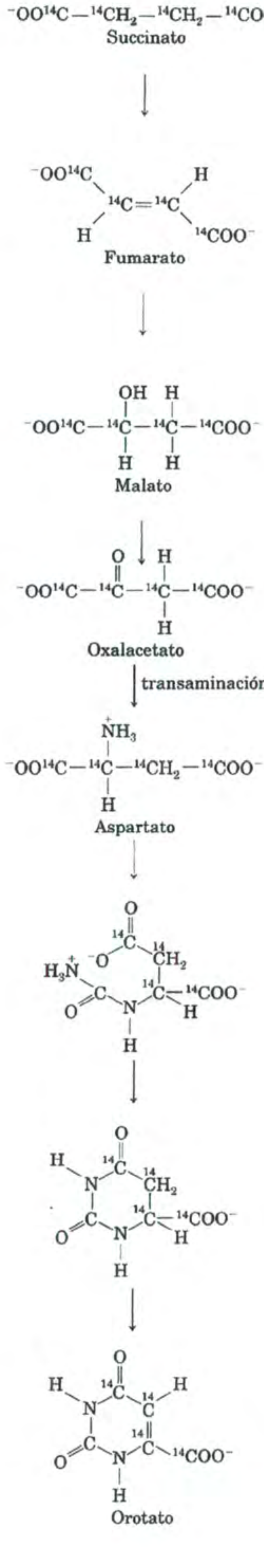
12. **(a)** Véase la Figura 18–6, paso ② para el mecanismo de reacción de la racemización de aminoácidos. El átomo de F de la fluoroalanina es un excelente grupo saliente. La fluoroalanina produce inhibición irreversible (covalente) de la alanina racemasa. Un mecanismo plausible es (Nuc denota cualquier cadena lateral nucleofílica de un aminoácido en el sitio activo del enzima):



(b) La azaserina (Fig. 22–48) es un análogo de la glutamina. El grupo diazoacetilo es muy reactivo y forma enlaces covalentes con nucleófilos del sitio activo de la glutamina amidotransferasa.

13. **(a)** Tal como se muestra en la Figura 18–16, el *p*-aminobenzoato es un componente del N^5, N^{10}-metilenotetrahidrofolato, el cofactor implicado en la transferencia de unidades monocarbonadas. **(b)** En presencia de sulfanilamida, un análogo estructural del *p*-aminobenzoato, las bacterias no pueden sintetizar tetrahidrofolato, un cofactor necesario para convertir AICAR en FAICAR, provocando la acumulación de AICAR. **(c)** La inhibición competitiva por la sulfanilamida del enzima implicado en la biosíntesis de tetrahidrofolato es superada por la adición de sustrato en exceso (*p*-aminobenzoato).

14. El orotato marcado con ^{14}C se produce mediante la ruta siguiente (los tres primeros pasos forman parte del ciclo del ácido cítrico):

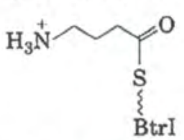


15. Los organismos no almacenan nucleótidos para utilizarlos como combustible y no los degradan completamente sino que los hidrolizan para liberar las bases, que se pueden rescatar mediante rutas de recuperación. La baja razón C:N de los nucleótidos hace que sean fuentes de energía pobres.

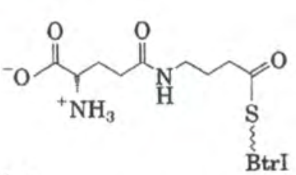
16. El tratamiento con alopurinol tiene dos consecuencias. (1) La conversión de hipoxantina en ácido úrico está inhibida llevando a la acumulación de hipoxantina, que es más soluble y se excreta más fácilmente; esto alivia los problemas clínicos asociados a la degradación de AMP. (2) La conversión de guanina en ácido úrico está inhibida produciendo la acumulación de xantina, la cual es menos soluble que el ácido úrico; ésta es la fuente de los cálculos de xantina. Dado que la degradación de GMP es baja en relación a la degradación de AMP el daño al riñón causado por los cálculos de xantina es menor que el causado por la gota sin tratar.

17. 5-Fosforribosil-1-pirofosfato; éste es el primer aceptor de NH_3 en la ruta biosintética de purinas.

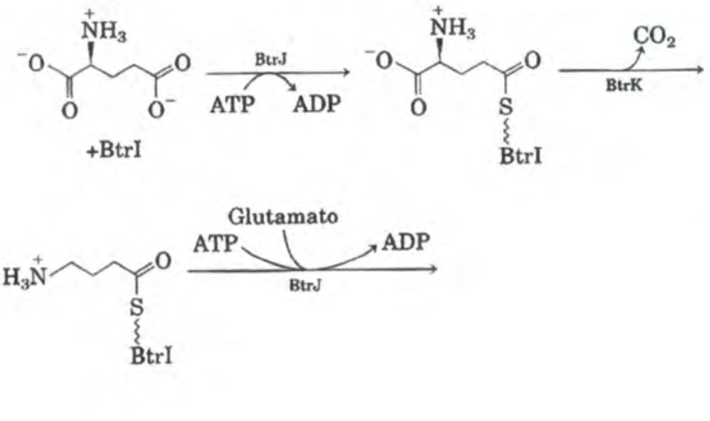
18. **(a)** Se elimina el grupo α-carboxilo y se añade un —OH al carbono γ. **(b)** BtrI tiene homología de secuencia con las proteínas portadoras de acilo. La masa molecular de BtrI aumenta cuando se incuba en condiciones en las que se puede adicionar CoA a la proteína. La adición de CoA a un residuo Ser reemplazaría un —OH (masa fórmula (FW) 17) con un grupo 4′-fosfopanteteína (véase la Fig. 21-5, p. 809). Este grupo tiene la fórmula $C_{11}H_{21}N_2O_7PS$ (FW 356). Así, 11.182 − 17 + 356 = 12.151, muy próximo a la M_r observada de 12.153. **(c)** El tioéster se podría formar con el grupo α-carboxilo. **(d)** En la reacción más común para eliminar el grupo α-carboxilo de un aminoácido (véase la Fig. 18–6c, p. 679), el grupo carboxilo ha de estar libre. Además, es difícil imaginarse una reacción de descarboxilación que empiece con un grupo carboxilo es su forma tioéster. **(e)** 12.240 − 12.281 = 41, próximo a la M_r del CO_2 (44). Dado que BtrK es probablemente una descarboxilasa, su estructura más probable es la forma descarboxilada

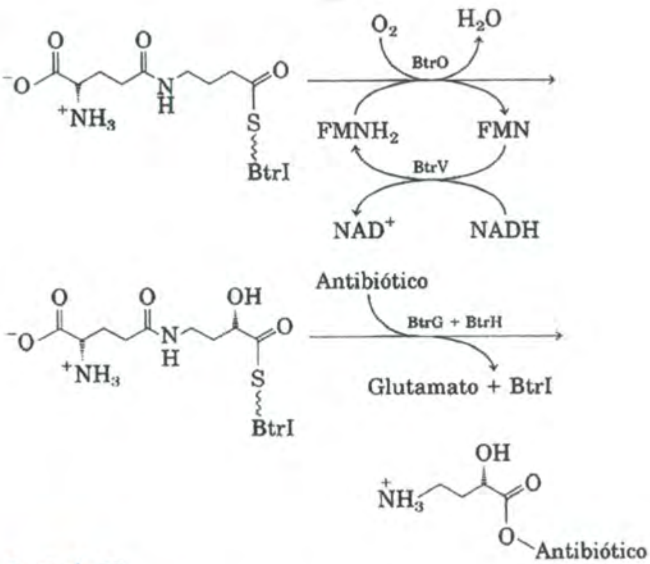


(f) 12.370 − 12.240 = 130. El ácido glutámico ($C_5H_9NO_4$; M_r 147), menos el —OH (17) eliminado en la reacción de glutamilación, deja un grupo glutamilo de FW 130; así, la γ-glutamilación de la molécula anterior añadiría 130 a su M_r. BtrJ es capaz de γ-glutamilar otros sustratos, por lo que puede γ-glutamilar la estructura anterior. El sitio más probable para ello es el grupo amino libre, lo que da la siguiente estructura:



(g)





Capítulo 23

1. Son reconocidas por dos receptores diferentes, encontrados de forma típica en células de tipos diferentes y están acopladas a efectos posteriores diferentes.

2. Los niveles de ATP en el estado estacionario se mantienen por la transferencia del grupo fosforilo desde la fosfocreatina al ADP. El 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno inhibe la creatina quinasa.

3. El amoníaco es muy tóxico para el tejido nervioso, especialmente el cerebro. El exceso de NH_3 se elimina mediante la transformación del glutamato en glutamina, la cual se desplaza hacia el hígado para transformarse posteriormente en urea. La glutamina adicional procede de la transformación de glucosa en α-cetoglutarato, transaminación del α-cetoglutarato a glutamato y conversión del glutamato en glutamina.

4. Los aminoácidos glucogénicos se utilizan para producir glucosa destinada al cerebro; otros se oxidan en la mitocondria a través del ciclo del ácido cítrico.

5. A partir de la glucosa mediante la siguiente ruta: Glucosa → dihidroxiacetona fosfato (en la glucólisis); dihidroxiacetona fosfato + NADH + H^+ → glicerol 3-fosfato + NAD^+ (reacción de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa)

6. **(a)** El aumento de la actividad muscular incrementa la demanda de ATP la cual se satisface con un incremento del consumo de O_2. **(b)** Después del sprint, el lactato producido por glucólisis anaeróbica se vuelve a convertir en glucosa y glucógeno, lo que requiere ATP y, por consiguiente, O_2.

7. La glucosa es el combustible principal del cerebro. La descarboxilación oxidativa dependiente de TPP del piruvato a acetil-CoA es esencial para completar el metabolismo de la glucosa.

8. 190 m

9. **(a)** La inactivación proporciona una manera rápida de cambiar la concentración hormonal. **(b)** El nivel de insulina se mantiene constante mediante velocidades de síntesis y de degradación iguales. **(c)** Cambios de velocidad en la liberación a partir de las reservas, en el transporte y en la conversión de la prohormona en hormona activa.

10. Las hormonas hidrosolubles se unen a receptores de la superficie exterior de la célula, desencadenando la formación de un segundo mensajero (como cAMP) dentro de la célula. Las hormonas liposolubles pueden pasar a través de la membrana plasmática para actuar sobre sus moléculas diana o directamente sobre sus receptores.

11. **(a)** Los músculos cardíaco y esquelético carecen del enzima glucosa 6-fosfatasa. Toda la glucosa 6-fosfato producida entra en la ruta glucolítica y en condiciones de deficiencia de O_2 se convierte en lactato vía piruvato. **(b)** En una situación de "lucha o huida", la concentración de precursores glucolíticos necesita ser elevada en preparación de la actividad muscular. Los intermediarios fosforilados no pueden escaparse de

la célula debido a que la membrana no es permeable a las especies cargadas y la glucosa 6-fosfato no se exporta mediante el transportador de glucosa. Por otro lado, el hígado debe liberar la glucosa necesaria para mantener el nivel sanguíneo de glucosa; la glucosa se forma a partir de la glucosa 6-fosfato y pasa al torrente circulatorio.

12. **(a)** Captación y utilización excesiva de glucosa sanguínea por el hígado que lleva a hipoglucemia; interrupción del catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos. **(b)** Hay poco combustible circulante para las necesidades de ATP. Se produce daño cerebral porque la glucosa es la fuente principal de combustible para el cerebro.

13. La tiroxina actúa como agente desacoplante de la fosforilación oxidativa. Los desacoplantes disminuyen la razón P/O y el tejido ha de aumentar la respiración para satisfacer la demanda normal de ATP. La termogénesis también podría ser debida al aumento en la velocidad de utilización de ATP por el tejido estimulado por el tiroides, debido a que el incremento en la demanda de ATP es satisfecho por un aumento de la fosforilación oxidativa, es decir la respiración.

14. Debido a que las prohormonas son inactivas, pueden almacenarse en cantidad en los gránulos secretores. La activación rápida se consigue por corte enzimático en respuesta a una señal adecuada.

15. En los animales, muchos precursores conducen a la síntesis de glucosa (véase la Fig. 14–15). En el ser humano, los precursores principales son el glicerol de los triacilgliceroles y los aminoácidos glucogénicos de las proteínas.

16. El ratón *ob/ob*, que inicialmente es obeso, perderá peso. El ratón *OB/OB* mantendrá su peso corporal normal.

17. IMC = 39,3: Para un IMC de 25, el peso ha de ser 75 kg; ha de perder 43 kg.

18. Secreción de insulina reducida. La valinomicina tiene el mismo efecto que abrir el canal de K^+, permitiendo la salida de K^+ y la consiguiente hiperpolarización.

19. El hígado no recibe el mensaje de la insulina por lo que sigue teniendo elevadas concentraciones de glucosa 6-fosfatasa y gluconeogénesis, aumentando la glucosa sanguínea tanto durante un ayuno como tras una comida que contiene glucosa. La glucosa sanguínea elevada desencadena la liberación de insulina de las células β pancreáticas, de ahí los niveles elevados de insulina en sangre.

20. Algunas cosas a tener en consideración: ¿Cuál es la frecuencia del ataque cardíaco que se ha de atribuir al medicamento? ¿De qué modo se compara esta frecuencia con el número de individuos a los que se les han evitado las consecuencias a largo plazo de la diabetes de tipo 2? ¿Hay otras opciones asequibles de tratamiento, de la misma eficacia, con menos efectos adversos?

21. Sin la actividad glucosidasa intestinal, se reduce la absorción de glucosa a partir del glucógeno y del almidón de la dieta suavizando el aumento usual de la glucosa sanguínea después de una comida. Los oligosacáridos no digeridos son fermentados por las bacterias del intestino grueso y los gases liberados producen malestar intestinal.

22. **(a)** El cierre del canal de K^+ regulado por ATP despolariza la membrana, lo que lleva a un aumento en la liberación de insulina. **(b)** La diabetes de tipo 2 se debe a un descenso de sensibilidad a la insulina, no a un déficit en la producción de insulina; el aumento de los niveles circulantes de insulina reduce los síntomas asociados con esta enfermedad. **(c)** Los individuos con diabetes de tipo 1 tienen células β pancreáticas deficientes, por lo que el gliburide no tendrá efectos beneficiosos. **(d)** El yodo, como el cloro (el átomo que reemplaza en el gliburide marcado), es un halógeno, pero es un átomo más grande que tiene propiedades químicas algo diferentes. Es posible que el gliburide yodado no se una a SUR. Si por el contrario se une a otra molécula el experimento, llevaría a la clonación del gen de esta otra proteína incorrecta. **(e)** Aunque se ha "purificado" una proteína, la preparación "purificada" podría ser una mezcla de varias proteínas que copurifican en estas condiciones experimentales. En este caso la secuencia de aminoácidos podría ser la de una proteína que copurifica con SUR. El empleo de anticuerpos que muestran que las secuencias peptídicas están presentes en SUR, excluye esta posibilidad. **(f)** Aunque el gen clonado codifica la secuencia de 25 aminoácidos encontrada en SUR podría tratarse de un gen que codifica la misma secuencia en otra proteína. En este caso, este otro gen se expresaría muy probablemente en diferentes células que el gen *SUR*. Los resultados de hibridación de mRNA son consistentes con que el supuesto cDNA de *SUR* realmente codifica SUR. **(g)** El exceso de gliburide no marcado compite con el gliburide marcado por el sitio de unión en SUR. En consecuencia, el gliburide marcado se une significativamente menos, por lo que se detecta muy poca o nula radiactividad en la proteína de 140 kDa. **(h)** En ausencia de un exceso de gliburide marcado, la proteína de 140 kDa marcada sólo se encuentra en presencia del supuesto cDNA de *SUR*. El exceso de gliburide no marcado compite con el gliburide marcado y no se detecta proteína de 140 kDa marcada con ^{125}I. Esto demuestra que el cDNA produce una proteína de unión al gliburide de la misma masa molecular que SUR, prueba importante de que el gen clonado codifica la proteína SUR. **(i)** Varios pasos adicionales son posibles, como: (1) Expresar el supuesto cDNA de *SUR* en células CHO (ovario de hámster chino) y demostrar que las células transformadas tienen actividad canal de K^+ regulada por ATP. (2) Demostrar que las células HIT con mutaciones en el supuesto gen *SUR* carecen de actividad canal de K^+ regulada por ATP. (3) Demostrar que animales de experimentación o pacientes humanos con mutaciones en el supuesto gen *SUR* son incapaces de secretar insulina.

Capítulo 24

1. $6,1 \times 10^4$ nm; 290 veces más largo que la cabeza del fago T2

2. Dado que ni el número de residuos de A y T ni el de residuos G y C son iguales, el DNA no puede ser una doble hélice de bases apareadas; el DNA del M13 es de cadena sencilla.

3. $M_r = 3,8 \times 10^8$; longitud = 200 μm; Lk_o = 55.200; Lk = 51.900

4. Los exones contienen 3 pb/aminoácido × 192 aminoácidos = 576 pb. Los 864 pb restantes están presentes en intrones y, posiblemente, en una secuencia señal y/o en otro DNA no codificante.

5. 5.000 pb. **(a)** No cambia; *Lk* no puede cambiar sin romper y reformar el armazón covalente del DNA. **(b)** Se hace indefinido; un DNA circular con un corte en una hebra no tiene, por definición, *Lk*. **(c)** Disminuye; en presencia de ATP la girasa desenrolla el DNA. **(d)** No cambia; esto supone que ninguna de las dos hebras de DNA se rompió durante el proceso de calentamiento.

6. Para que *Lk* permanezca inalterada, la topoisomerasa ha de introducir el mismo número de superenrollamientos positivos y negativos.

7. σ = −0,067; probabilidad >70 %

8. **(a)** Sin definir; las hebras de un DNA mellado podrían separarse y por tanto no tienen *Lk*. **(b)** 476 **(c)** 476; el DNA ya está relajado, por lo que la topoisomerasa no produce ningún cambio. **(d)** 460; la girasa más ATP reduce el *Lk* en incrementos de 2. **(e)** 464; las topoisomerasas de tipo I eucarióticas aumentan el *Lk* del DNA desenrollado o superenrollado negativamente en incrementos de 1. **(f)** 460; la unión del nucleosoma no rompe ninguna hebra de DNA y no hay cambio en *Lk*.

9. Una unidad estructural fundamental en la cromatina se repite aproximadamente cada 200 pb; el DNA es accesible a la nucleasa sólo a intervalos de 200 pb. El tratamiento breve fue insuficiente para cortar el DNA en cada punto accesible, por lo que se creó una escalera de bandas de DNA en la que el tamaño de los fragmentos de DNA eran múltiplos de 200 pb. El grosor de las bandas de DNA sugiere que la distancia entre los sitios de rotura es algo variable. Por ejemplo, no todos los fragmentos de la banda inferior tienen exactamente 200 pb.

10. Una hélice dextrógira tiene un *Lk* positivo; una hélice levógira (como la del Z-DNA) tiene un *Lk* negativo. La disminución del *Lk* de una molécula circular cerrada de B-DNA por desenrollamiento facilita la formación de regiones de Z-DNA en ciertas secuencias. (Véase el Capítulo 8, p. 281, para una descripción de las secuencias que permiten la formación de Z-DNA.)

11. **(a)** Ambas hebras han de estar cerradas covalentemente y la molécula ha de ser o circular o constreñida en los dos extremos. **(b)** Está favorecida la formación de cruciformes, Z-DNA levógiro, superenro-

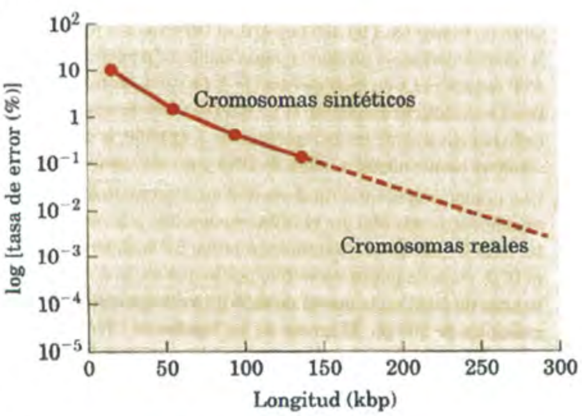
llamientos plectonémicos o solenoides y el desenrollamiento del DNA. **(c)** DNA topoisomerasa II o DNA girasa de *E. coli*. **(d)** Se une al DNA en un punto donde se cruza sobre sí mismo, corta las dos hebras de uno de los segmentos cruzados, pasa el otro segmento a través del corte y resella el corte. El resultado es un cambio en *Lk* de -2.

12. Un centrómero, telómeros y una secuencia replicante autónoma u origen de replicación.

13. El nucleoide bacteriano está organizado en dominios de aproximadamente 10.000 pb de longitud. El corte por un enzima de restricción relaja el DNA dentro de un dominio pero no fuera del dominio. Cualquier gen en el dominio cortado para el que la expresión está afectada por la topología del DNA se verá afectado por el corte del dominio; no así los genes fuera del dominio.

14. **(a)** Cuando se sellan los extremos del DNA para crear un círculo cerrado y relajado, algunas especies de DNA están completamente relajadas pero otras han quedado atrapadas en estados algo sub- o superenrollados. Esto da lugar a una distribución de topoisómeros centrados en las especies más relajadas. **(b)** Superenrollamiento positivo. **(c)** El DNA que está relajado a pesar de la adición de colorante es DNA con una o ambas hebras rotas. Los procedimientos de aislamiento de DNA introducen inevitablemente un pequeño número de roturas de la hebra en algunas de las moléculas circulares cerradas. **(d)** Aproximadamente –0,05. Se determina sencillamente comparando DNA nativo con muestras de σ conocido. En ambos geles, el DNA nativo migra de manera más próxima a la muestra de $\sigma = -0{,}049$.

15. **(a)** En la no disyunción, una célula hija y todos sus descendientes reciben dos copias del cromosoma sintético y son blancas; la otra célula hija y todos sus descendientes no tienen copia del cromosoma sintético y son rojas. Esto da lugar a una colonia medio blanca y medio roja. **(b)** En la pérdida de cromosomas, una célula hija y todos sus descendientes tienen una copia del cromosoma sintético y son rosa; la otra hija y todos sus descendientes no tienen copias del cromosoma sintético y son rojas. Esto da lugar a una colonia medio rosa medio roja. **(c)** El centrómero funcional mínimo ha de tener menos de 0,63 kpb, ya que todos los fragmentos de este tamaño o mayores confieren estabilidad mitótica relativa. **(d)** Los telómeros son necesarios para replicar totalmente un DNA lineal; una molécula circular puede replicarse sin ellos. **(e)** Cuanto más grande es el cromosoma más fielmente se segrega. Los datos no muestran ni un mínimo tamaño por debajo del cual el cromosoma sintético es completamente inestable ni un tamaño máximo por encima del cual la estabilidad ya no cambia más.
(f)



Tal como se muestra en el gráfico, incluso si los cromosomas sintéticos eran tan largos como los cromosomas de levadura normales no eran tan estables. Esto sugiere que otros elementos, aún no descubiertos, son necesarios para la estabilidad.

Capítulo 25

1. En una replicación al azar, dispersiva, todo el DNA en la segunda generación habría tenido la misma densidad y habría aparecido como una sola banda, no las dos bandas observadas en el experimento de Meselson-Stahl.

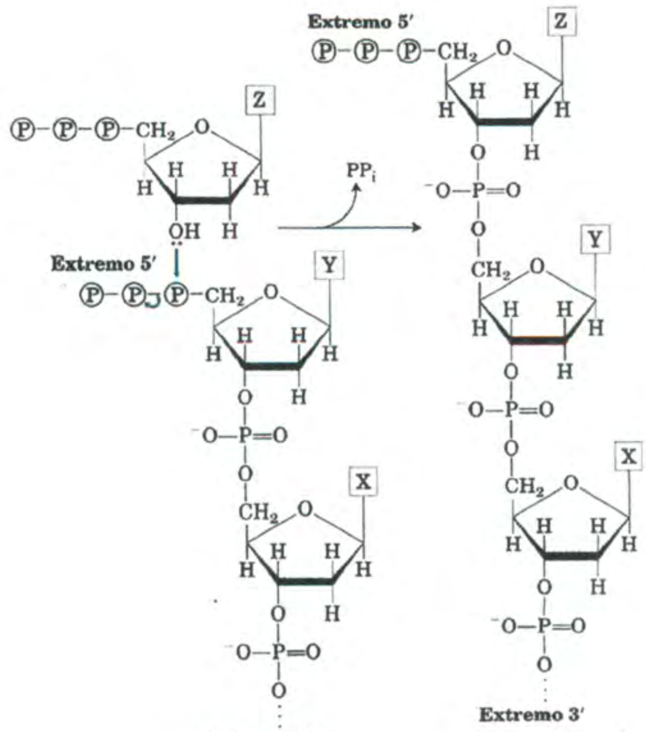
2. En esta continuación del experimento de Meselson-Stahl después de tres generaciones la razón molar de ^{15}N–^{14}N DNA a ^{14}N–^{14}N DNA es 2/6 = 0,33.

3. **(a)** 4,42 × 10^5 vueltas; **(b)** 40 min. Cuando las células se dividen cada 20 min, se inicia un ciclo replicativo cada 20 min, empezando cada ciclo antes de que se haya completado el precedente. **(c)** Se forman alrededor de 2.000 a 5.000 fragmentos de Okazaki. Estos fragmentos tienen una longitud de 1.000 a 2.000 nucleótidos y están fuertemente unidos a la hebra molde mediante apareamiento de bases. Cada fragmento se une rápidamente a la hebra rezagada, conservando así el orden correcto de los fragmentos.

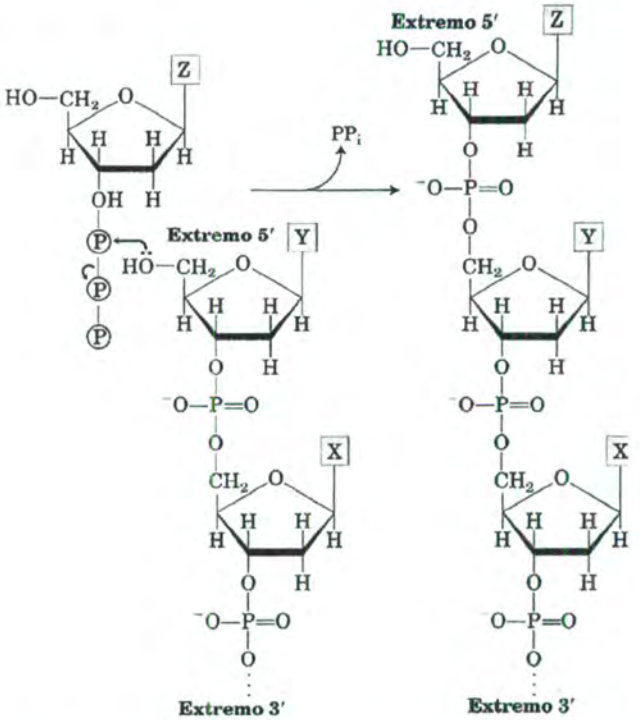
4. A, 28,7%; G, 21,3%; C, 21,3%; T, 28,7%. La hebra de DNA sintetizada a partir de la hebra molde: A, 32,7%; G, 18,5 %; C, 24,1 %; T, 24,7%. La hebra de DNA sintetizada a partir de la hebra molde complementaria tendría A, 24,7%; G, 24,1 %; C, 18,5%; T, 32,7%. Se supone que las dos hebras molde se replican completamente.

5. **(a)** No. La incorporación de ^{32}P al DNA es el resultado de la síntesis de nuevo DNA, que requiere la presencia de *los cuatro* nucleótidos precursores. **(b)** Sí. Aunque los cuatro nucleótidos precursores han de estar presentes para que haya síntesis de DNA, sólo uno de ellos ha de ser radiactivo para ver radiactividad en el nuevo DNA. **(c)** No. Sólo se incorpora radiactividad si la marca de ^{32}P está en el fosfato α; la DNA polimerasa separa pirofosfato, es decir los grupos fosfato β y γ.

6. *Mecanismo 1:* El 3′ –OH de un dNTP entrante ataca el fosfato α del trifosfato en el extremo 5′ de la cadena creciente de DNA, desplazando pirofosfato. Este mecanismo utiliza dNTP normales y el extremo en crecimiento del DNA siempre tiene un trifosfato en el extremo 5′.



Mecanismo 2: Éste utiliza un tipo nuevo de precursor, nucleósido 3′-trifosfatos. El extremo en crecimiento de la cadena de DNA tiene un 5′-OH, que ataca el fosfato α de un desoxinucleósido 3′-trifosfato entrante, desplazando pirofosfato. Observe que este mecanismo requeriría la evolución de nuevas rutas metabólicas para suministrar los desoxinucleósidos 3′-fosfato necesarios.



7. *Hebra conductora:* Precursores: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (también necesita una hebra de DNA molde y un cebador de DNA); enzimas y otras proteínas: DNA girasa, helicasa, proteína fijadora de DNA de cadena sencilla, DNA polimerasa III, topoisomerasas y pirofosfatasa. *Hebra rezagada:* Precursores: ATP, GTP, CTP, UTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP (también necesita un cebador de RNA); enzimas y otras proteínas: DNA girasa, helicasa, proteína fijadora de DNA de cadena sencilla, primasa, DNA polimerasa III, DNA polimerasa I, DNA ligasa, topoisomerasas y pirofosfatasa. También se requiere NAD^+ como cofactor para la DNA ligasa.

8. Los mutantes con DNA ligasa defectuosa producen dúplex de DNA en los que una de las hebras continúa formada por piezas (en forma de fragmentos de Okazaki). Cuando se desnaturaliza este dúplex, la sedimentación da lugar a una fracción con la cadena sencilla intacta (la banda de elevada masa molecular) y una fracción con los fragmentos sin empalmar (la banda de baja masa molecular).

9. El apareamiento de bases de Watson-Crick entre la hebra molde y la hebra conductora; corrección de pruebas y eliminación de los nucleótidos insertados de manera equivocada por la actividad 3'-exonucleasa de la DNA polimerasa III. Sí, quizá. Dado que los factores que aseguran la fidelidad de la replicación son operativos tanto en la hebra conductora como en la rezagada, la rezagada se sintetizaría probablemente con la misma fidelidad. Sin embargo, el mayor número de operaciones químicas distintas implicadas en la síntesis de la hebra rezagada podría proporcionar una mayor oportunidad para que surgiesen errores.

10. ~1.200 pb (600 en cada dirección)

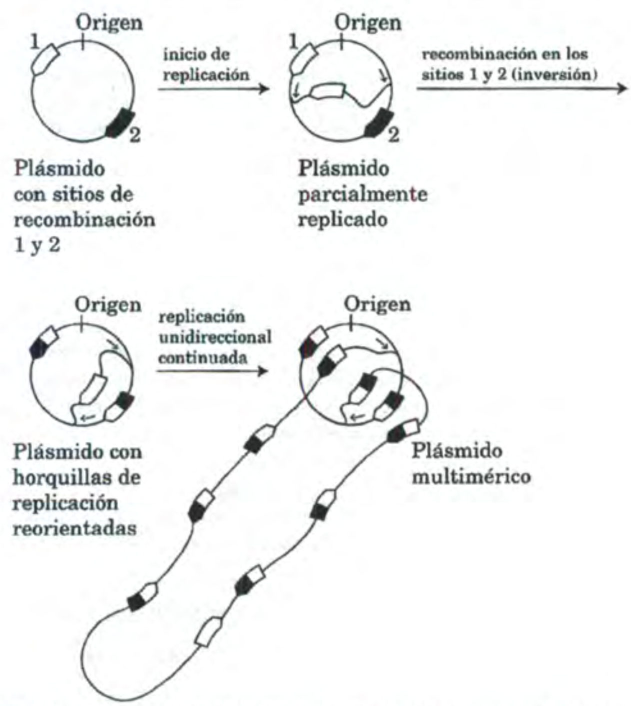
11. Una pequeña fracción (13 de 10^9 células) de los mutantes que requieren histidina experimenta espontáneamente una retromutación y recuperan su capacidad de sintetizar histidina. El 2-aminoantraceno aumenta la tasa de retromutaciones unas 1.800 veces, por lo que es mutagénico. Dado que la mayoría de carcinógenos son mutagénicos, el 2-aminoantraceno es probablemente carcinogénico.

12. La desaminación espontánea de la 5-metilcitosina (véase la p. 289) produce timina y, por tanto, un apareamiento incorrecto G—T. Estos apareamientos incorrectos se encuentran entre los más frecuentes en el DNA de los eucariotas. El sistema de reparación especializado restaura el par G≡C.

13. **(a)** La irradiación ultravioleta produce dímeros de pirimidina; en los fibroblastos normales se eliminan mediante un proceso en el que se corta la hebra dañada por una excinucleasa especial. Así, el DNA de cadena sencilla desnaturalizado contiene un gran número de fragmentos producidos por el corte, con lo que la masa molecular media es menor. Estos fragmentos de DNA de cadena sencilla están ausentes en las muestras de XPG, tal como indica el hecho de que la masa molecular media no varíe. **(b)** La ausencia de fragmentos en el DNA de cadena sencilla de las células de XPG tras la irradiación sugiere que la excinucleasa especial es defectuosa o está ausente en esta células.

14. Durante la recombinación genética homóloga se puede formar un intermediario de Holliday prácticamente en cualquier lugar dentro de los dos cromosomas homólogos apareados; el punto de ramificación del intermediario puede desplazarse mucho mediante migración de rama. En la recombinación específica de sitio, el intermediario de Holliday se forma entre dos sitios específicos y la migración de rama está restringida generalmente por secuencias heterólogas a cualquier lado de los sitios de recombinación.

15. Una vez que la replicación ha transcurrido desde el origen a un punto en donde se ha replicado un sitio de recombinación pero no el otro, la recombinación específica de sitio no sólo invierte el DNA entre los sitos de recombinación sino que también cambia la dirección de una horquilla de replicación respecto a la otra. Éstas se perseguirán una a otra alrededor del círculo de DNA, generando muchas copias en tándem del plásmido. El círculo multimérico se puede resolver en monómeros mediante actos de recombinación específicos de sitio adicionales.



16. **(a)** Incluso en ausencia de un mutágeno añadido, se producen mutaciones basales debido a la radiación, reacciones químicas celulares y otros. **(b)** Si el DNA está suficientemente dañado, una cantidad sustancial de los productos génicos no serán funcionales y la célula será inviable. **(c)** Las células con una capacidad reducida para la reparación del DNA son más sensibles a los mutágenos. Debido a que reparan menos fácilmente las lesiones causadas por R7000, las bacterias uvr$^-$ tienen una mayor velocidad de mutación y una mayor probabilidad de efectos letales. **(d)** En la cepa uvr$^+$, el sistema de reparación por excisión elimina bases del DNA con [^{3}H]R7000 unido, disminuyendo el ^{3}H en estas células a lo largo del tiempo. En la cepa uvr$^-$ no se repara el DNA y el nivel de ^{3}H aumenta a medida que [^{3}H]R7000 continúa reaccionando con el DNA. **(e)** Todas las mutaciones señaladas en la tabla excepto A═T a G≡C muestran aumentos significativos respecto al nivel básico. Cada tipo de mutación es debida a un tipo de interacción diferente entre R7000 y el DNA. Dado que tipos de interacciones diferentes no son igualmente probables (debido a diferencias en reactividad, impedimen-

tos estéricos, etc.) las mutaciones resultantes tienen lugar con frecuencias diferentes. **(f)** No. Sólo las que empiezan con un par de bases G≡C se explican con este modelo. Así A=T a C≡G y A=T a T=A han de ser debidas a la unión de R7000 a una A o una T. **(g)** R7000-G se aparea con A. Primero R7000 se adiciona a G≡C para dar R7000-G≡C. (Compare esto con lo que sucede con el CH_3-G de la Fig. 25-28b, p. 1000). Si esto no se repara, una hebra se replicará como R7000-G=A que se repara a T=A. La otra hebra es de tipo salvaje. Si la replicación produce R7000-G=T, una ruta similar lleva a un par de bases A=T. **(h)** No. Compare los datos en las dos tablas y tenga presente que mutaciones diferentes se producen con frecuencias diferentes.

A=T a C≡G: moderada en las dos hebras; pero se repara mejor en la cepa uvr$^+$

G≡C a A=T; moderada en ambas; no hay diferencia real

G≡C a C≡G; más elevada en uvr$^+$; ¡ciertamente menos reparación!

G≡C a T=A; alta en ambas; no hay diferencia real

A=T a T=A; alta en ambas; no hay diferencia real

A=T a G≡C; baja en ambas; no hay diferencia real

Ciertos aductos se pueden reconocer más fácilmente que otros por el aparato de reparación y así se reparan más rápidamente dando como resultado menos mutaciones.

Capítulo 26

1. **(a)** 60 a 100 s; **(b)** 500 a 900 nucleótidos
2. Un solo error de base no corregido en la replicación del DNA podría hacer que una de las dos células hijas, y toda su descendencia, tuviese un cromosoma mutado. Un único error en una base en la transcripción del RNA no afectaría al cromosoma; conduciría a la formación de algunas copias defectuosas de una proteína, pero debido a que el mRNA se recambia rápidamente la mayoría de copias de la proteína no serían defectuosas. La progenie de esta célula sería normal.
3. La modificación postranscripción normal en el extremo 3′ (corte y poliadenilación) estaría inhibida o bloqueada.
4. Dado que la hebra molde de RNA no codifica los enzimas necesarios para iniciar la infección vírica, probablemente sería inerte o simplemente sería degradada por las ribonucleasas celulares. La replicación de la hebra molde de RNA y la propagación del virus sólo podrían tener lugar si la RNA replicasa intacta (RNA polimerasa dependiente de RNA) se introdujese en la célula junto con la hebra molde.
5. (1) Utilización de una hebra molde de ácido nucleico; (2) síntesis en la dirección 5′→3′; (3) utilización de sustratos nucleósidos trifosfato con formación de un enlace fosfodiéster y desplazamiento de PP_i. La polinucleótido fosforilasa forma enlaces fosfodiéster pero difiere en todo el resto de propiedades señaladas.
6. Generalmente dos: una para romper el enlace fosfodiéster en una unión intrón-exón y la otra para ligar el exón libre resultante y el exón al otro lado del intrón. Si el nucleófilo en el primer paso fuese el agua este paso sería una hidrólisis y sólo se requeriría un paso de transesterificación para completar el proceso de corte y empalme.
7. Muchos snoRNA requeridos para las reacciones de modificación del rRNA están codificados en intrones. Si no se produce el corte y empalme no se producen los snoRNA.
8. Estos enzimas carecen de una actividad 3′→5′ exonucleasa correctora de pruebas y tienen una tasa de error elevada; la probabilidad de un error de replicación que inactivaría el virus es mucho menor en un genoma pequeño que en uno grande.
9. **(a)** $4^{32} = 1{,}8 \times 10^{19}$ **(b)** 0,006% **(c)** Para el paso de "selección no natural", utilice una resina cromatográfica a la que esté unida una molécula que sea un análogo del estado de transición de la reacción de hidrólisis del éster (por ejemplo, un compuesto fosfonato adecuado; véase el Recuadro 6–3).
10. Aunque la síntesis de RNA se detiene rápidamente por la toxina α-amanitina, se tardan días para que se degraden los mRNA y proteínas críticos en el hígado, lo que produce disfunción hepática y muerte.
11. **(a)** Después de la lisis de las células y purificación parcial del contenido, se puede someter el extracto proteico a enfoque isoeléctrico. La subunidad β podría ser detectada mediante un ensayo basado en anticuerpo. Las diferencias en residuos aminoácidos entre la subunidad β normal y la forma mutada (es decir, las diferentes cargas en los aminoácidos) alterarían la movilidad electroforética de la proteína mutante en un gel de enfoque isoeléctrico en relación a la proteína de una cepa no resistente. **(b)** Secuenciación directa del DNA (por el método de Sanger).
12. **(a)** 384 pares de nucleótidos **(b)** 1.620 pares de nucleótidos **(c)** La mayor parte de los nucleótidos son regiones sin traducir en los extremos 3' y 5' del mRNA. Además, la mayoría de mRNA codifican una secuencia señal (Capítulo 27) en sus productos proteicos, la cual es finalmente cortada para producir la proteína madura y funcional.
13. **(a)** El cDNA se produce por transcripción inversa del mRNA; así, la secuencia del mRNA es probablemente CGG. Debido a que el DNA genómico transcrito para hacer el mRNA tiene la secuencia CAG, el transcrito primario más probable tiene CAG que se modifica postranscripcionalmente a CGG. **(b)** La secuencia de mRNA no editada es la misma que la del DNA (excepto que U reemplaza a T). El mRNA sin editar tiene la secuencia (* indica sitio de edición)

```
                                     *
(5')...GUCUCUGGUUUUCCUUGGGUGCCUUUAUGCAGCAAGGAUGCGAUAUUUCGCCAAG...(3')
```

En el paso 1, el cebador 1 se aparea tal como se señala:

```
                                     *
(5')...GUCUCUGGUUUUCCUUGGGUGCCUUUAUGCAGCAAGGAUGCGAUAUUUCGCCAAG...(3')
                                      ||||||||||||||||||||||||
                      Cebador 1: (3')–CGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC–(5')
```

cDNA (subrayado) se sintetiza de derecha a izquierda:

```
                                     *
(5')...GUCUCUGGUUUUCCUUGGGUGCCUUUAUGCAGCAAGGAUGCGAUAUUUCGCCAAG...(3')
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
(3')...CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAAATACGTCGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC–(5')
```

A continuación el paso 2 da precisamente el cDNA:

```
                                     *
(3')...CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAAATACGTCGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC–(5')
```

En el paso 3, el cebador 2 se aparea con el cDNA:

```
       Cebador 2: (5')–CCTTGGGTGCCTTTA–(3')
                   |||||||||||||||
(3')...CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAAATACGTCGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC–(5')
                                 *
```

La DNA polimerasa adiciona nucleótidos al extremo 3′ del cebador. Moviéndose de izquierda a derecha inserta T, G, C y A. Sin embargo, debido a que A del ddATP carece del —OH en 3′ necesario para unir el nucleótido siguiente, la cadena no se alarga más allá de este punto. Esta A se muestra en *cursiva*; el nuevo DNA está subrayado:

```
        Cebador 2: (5')–CCTTGGGTGCCTTTATGCA
                        |||||||||||||||||||
(3')...CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAAATACGTCGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC–(5')
                                            *
```

Esto da un fragmento de 19 nucleótidos para el transcrito sin editar. En el transcrito editado, la *A se cambia a G; en el cDNA esto corresponde a C. Al principio del paso 3:

```
        Cebador 2: (5')–CCTTGGGTGCCTTTA–(3')
                        |||||||||||||||
(3')...CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAAATACGCCGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC–(5')
                                        *
```

En este caso, la DNA polimerasa puede alargar más allá de la base editada y se parará en la siguiente T del cDNA. La didesoxi A está en *cursiva*; el nuevo DNA está subrayado.

```
        Cebador 2: (5')–CCTTGGGTGCCTTTATGCGGCA
                        ||||||||||||||||||||||
(3')...CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAAATACGCCGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC–(5')
```

Esto da el producto de 22 nucleótidos. **(c)** Tratamientos (proteasas, calor) que se sabe que destruyen la función proteica inhiben la actividad editora, mientras que tratamientos (nucleasa) que no afectan a las proteínas tienen poco o nulo efecto sobre la edición. Una debilidad clave de este argumento es que los tratamientos de destrucción de las proteínas no abolen completamente la edición. Podría haber alguna edición o degradación basal del mRNA incluso sin el enzima, o alguno de los enzimas podría sobrevivir a los tratamientos. **(d)** Sólo el fosfato en α de los NTP se incorpora en los polinucleótidos. Si los investigadores hubiesen utilizado otros tipo de [^{32}P]NTP, no se hubiese marcado ninguno de los productos. **(e)** Dado que sólo se edita A, sólo es de interés el destino de cualquier A de la secuencia de interés. **(f)** Dado que sólo se marcó ATP, si se hubiese eliminado todo el nucleótido se habría eliminado toda la radiactividad del mRNA, de modo que en la placa cromatográfica sólo estaría presente [^{32}P]AMP sin modificar. **(g)** Si se hubiese eliminado y reemplazado la base, se esperaría ver sólo [^{3}H]AMP. La presencia de [^{3}H]AMP indica que el cambio de A a I tiene lugar sin eliminación de H en las posiciones 2 y 8. El mecanismo más probable es la modificación química de A a I mediante desaminación hidrolítica (véase la Fig. 22–34, p. 885). **(h)** CAG se cambia a CIG. Este codón se lee como CGG.

Capítulo 27

1. **(a)** Gly–Gln–Ser–Leu–Leu–Ile **(b)** Leu–Asp–Ala–Pro **(c)** His–Asp–Ala–Cys–Cys–Tyr **(d)** Met–Asp–Glu en eucariotas; fMet–Asp–Glu en bacterias
2. UUAAUGUAU, UUGAUGUAU, CUUAUGUAU, CUCAUGUAU, CUAAUGUAU, CUGAUGUAU, UUAAUGUAC, UUGAUGUAC, CUUAUGUAC, CUCAUGUAC, CUAAUGUAC, CUGAUGUAC
3. No. Dado que casi todos los aminoácidos tienen más de un codón (por ejemplo Leu tiene seis), un polipéptido dado puede estar codificado por una serie de secuencias de bases diferentes. Sin embargo, algunos aminoácidos están codificados por un solo codón y los que tienen múltiples codones a menudo comparten el mismo nucleótido en dos de las tres posiciones por lo que *ciertas partes* de la secuencia de mRNA que codifican una proteína de secuencia de aminoácidos conocida se pueden predecir con alta certidumbre.
4. **(a)** (5′)CGACGGCGCGAAGUCAGGGGUGUUAAG(3′) **(b)** Arg–Arg–Arg–Glu–Val–Arg–Gly–Val–Lys **(c)** No. Las hebras complementarias antiparalelas del DNA duplohelicoidal no tienen la misma secuencia de bases en la dirección 5′→3′. El RNA se transcribe desde una sola hebra específica del DNA dúplex. La RNA polimerasa debe, por tanto, reconocer y fijarse a la hebra correcta.
5. Hay dos tRNA para la metionina: $tRNA^{fMet}$, que es el tRNA de inicio y $tRNA^{Met}$ que puede insertar un residuo Met en posiciones interiores de un polipéptido. Sólo fMet-$tRNA^{fMet}$ es reconocido por el factor de inicio IF-2 y alineado con el AUG iniciador situado en el sitio P ribosómico en el complejo de inicio. Los codones AUG en el interior del mRNA pueden unir e incorporar solamente Met-$tRNA^{Met}$.
6. Deje que la polinucleótido fosforilasa actúe sobre una mezcla de UDP y CDP en la que UDP tenga, por ejemplo, cinco veces la concentración de CDP. El resultado sería un polímero de RNA sintético con muchos tripletes UUU (que codifican Phe), un número menor de UUC (Phe), UCU (Ser) y CUU (Leu) y un número aún mucho menor de UCC (Ser), CUC (Leu) y CCU (Pro) y el número más bajo de CCC (Pro).
7. Un mínimo de 583 equivalentes de ATP (basado en 4 por residuo aminoácido añadido, excepto que hay solamente 145 pasos de translocación). La corrección de cualquier error requiere 2 equivalentes de ATP. Para la síntesis del glucógeno se utilizarían 292 equivalentes de ATP. El coste energético extra necesario para la síntesis de la β-globina refleja el coste del contenido en información de la proteína. Al menos 20 enzimas activadores, 70 proteínas ribosómicas, 4 rRNA, 32 o más tRNA, un mRNA y 10 o más enzimas auxiliares han de ser fabricados por la célula eucariótica para sintetizar una proteína a partir de aminoácidos. La síntesis de una cadena ($\alpha1\rightarrow4$) de glucógeno a partir de glucosa sólo requiere 4 o 5 enzimas (Capítulo 15).
8.

Codones de glicina	Anticodones
(5′)GGU	(5′)ACC, GCC, ICC
(5′)GGC	(5′)GCC, ICC
(5′)GGA	(5′)UCC, ICC
(5′)GGG	(5′)CCC, UCC

(a) El extremo 3′ y la posición del medio **(b)** Los apareamientos con los anticodones (5′)GCC, ICC y UCC **(c)** Los apareamientos con los anticodones (5′)ACC y CCC

9. (a), (c), (e) y (g) sólo; (b), (d) y (f) no pueden ser el resultado de mutaciones de una sola base; (b) y (f) requerirían sustituciones de dos bases y (d) requeriría sustituciones de las tres bases.
10. Los dos codones de DNA para Glu son GAA y GAG y los cuatro codones de DNA para la Val son GTT, GTC, GTA y GTG. Un solo cambio de base en GAA para dar GTA o en GAG para dar GTG podría explicar la sustitución Glu → Val en la hemoglobina falciforme. Mucho menos probables son los cambios de dos bases de GAA a GTG, GTT o GTC; y de GAG a GTA, GTT o GTC.
11. La isoleucina es similar en estructura a otros aminoácidos, en especial valina. La distinción entre valina e isoleucina en el proceso de aminoacilación requiere el segundo filtro de una función correctora de pruebas. La histidina tiene una estructura diferente de la de cual-

quier otro aminoácido y su estructura proporciona oportunidades para una especificidad de unión adecuada para asegurar una aminoacilación precisa del tRNA afín.

12. **(a)** La Ala-tRNA sintetasa reconoce el par de bases G^3–U^{70} en el brazo del aminoácido de $tRNA^{Ala}$. **(b)** El $tRNA^{Ala}$ mutante insertaría residuos Ala en codones que codifican Pro. **(c)** Una mutación que podría tener efectos similares es una alteración en $tRNA^{Pro}$ que permitiese su reconocimiento y la aminoacilación por parte de la Ala-tRNA sintetasa. **(d)** La mayoría de proteínas de la célula serían inactivas por lo que estas mutaciones serían letales, de ahí que nunca se hayan podido observar. Esto representa una poderosa presión selectiva para mantener el código genético.

13. El último aminoácido añadido a una cadena polipeptídica en crecimiento es el único que está unido covalentemente a un tRNA y de ahí que sea el único enlace entre el polipéptido y el mRNA que lo codifica. Una actividad correctora de pruebas cortaría esta unión, deteniendo de este modo la síntesis del polipéptido y liberándolo del mRNA.

14. La proteína será dirigida hacia el retículo endoplasmático y de allí su destino dependerá de señales adicionales. La SRP se une a la señal amino-terminal al principio de la síntesis proteica y dirige el polipéptido naciente y el ribosoma hacia receptores del RE. Debido a que se transloca la proteína a la luz del RE a medida que se va sintetizando, la NLS (señal de localización nuclear) no será nunca accesible a las proteínas implicadas en dirigirla hacia el núcleo.

15. El factor desencadenante es una chaperona molecular que estabiliza una conformación desplegada y competente para la translocación de ProOmpA.

16. DNA con un mínimo de 5.784 pb; algunas de las secuencias codificantes han de estar solapadas.

17. **(a)** Las hélices se asocian a través de interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. **(b)** Los grupos R 3, 6, 7 y 10 se extienden a la izquierda; 1, 2, 4, 5, 8 y 9 se extienden hacia la derecha. **(c)** Una secuencia posible es

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
N–Phe–Ile–Glu–Val–Met–Asn–Ser–Ala–Phe–Gln–*C*

(d) Una secuencia de DNA posible para la secuencia de aminoácidos en (c) es

Hebra no molde
(5′)–TTTATTGAAGTAATGAATAGTGCATTCCAG–(3′)
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
(3′)–AAATAACTTCATTACTTATCACGTAAGGTC–(5′)
Hebra molde

(e) Phe, Leu, Ile, Met y Val. Todos son hidrofóbicos pero el conjunto no incluye *todos* los aminoácidos hidrofóbicos; faltan Trp, Pro, Ala y Gly. **(f)** Tyr, His, Gln, Asn, Lys, Asp y Glu. Todos éstos son hidrofílicos aunque Tyr es menos hidrofílico que los otros. El conjunto no incluye *todos* los aminoácidos hidrofílicos; faltan Ser, Thr y Arg. **(g)** La omisión de T en la mezcla excluye los codones que empiezan con T, por lo que se excluyen Tyr, que no es muy hidrofílico, y, más importante aún, se excluyen los dos codones de stop posibles (TAA y TAG). En el conjunto NAN no se excluyen otros aminoácidos al omitir T. **(h)** Las proteínas mal plegadas se degradan a menudo en la célula. Por tanto, si un gen sintético ha producido una proteína que forma una banda en el gel de SDS, es probable que tal proteína se haya plegado correctamente. **(i)** El plegamiento de las proteínas depende de otras interacciones además de las hidrofóbicas y las de van der Waals. Existen muchas razones por las que una proteína sintetizada con una secuencia al azar podría no plegarse en la estructura de cuatro hélices. Por ejemplo, los puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales hidrofílicas podrían destruir la estructura. Además, no todas las secuencias tienen igual tendencia a formar una hélice α.

Capítulo 28

1. **(a)** Los niveles de triptófano sintetasa permanecen altos a pesar de la presencia de triptófano. **(b)** Los niveles continúan siendo elevados. **(c)** Los niveles descienden rápidamente, impidiendo la síntesis derrochadora de triptófano.

2. **(a)** Expresión constitutiva a bajo nivel del operón; la mayoría de mutaciones en el operador harían que la fijación del represor fuese menos probable. **(b)** Expresión constitutiva, tal como sucede en (a) o represión constante, si la mutación destruyó la capacidad de unirse a lactosa y compuestos relacionados y, de ahí, la respuesta a los inductores. **(c)** Expresión aumentada o disminuida del operón (en condiciones en las que es inducido), según si la mutación hizo al promotor más o menos similar, respectivamente, al promotor consenso de *E. coli*.

3. 7.000 copias

4. 8×10^{-9} M, alrededor de 10^5 veces mayor que la constante de disociación. Con 10 copias de represor activo en la célula el sitio operador está siempre unido a la molécula represora.

5. **(a)–(e)** Todas las condiciones disminuirían la expresión de los genes del operón *lac*.

6. **(a)** Menor atenuación de la transcripción. El ribosoma que está completando la traducción de la secuencia 1 ya no se solaparía con la secuencia 2, bloqueándola; la secuencia 2 siempre estaría asequible para aparearse con la secuencia 3 impidiendo la formación de la estructura del atenuador. **(b)** Mayor atenuación de la transcripción. La secuencia 2 se aparearía de forma menos eficiente con la secuencia 3; la estructura del atenuador se formaría más a menudo, aun en el caso de que la secuencia 2 no esté bloqueada por un ribosoma. **(c)** No hay atenuación de la transcripción. La única regulación sería la debida al represor Trp. **(d)** La atenuación pierde su sensibilidad al tRNA de Trp. Podría hacerse sensible al tRNA de His. **(e)** La atenuación tendría lugar muy raramente o nunca. Las secuencias 2 y 3 siempre bloquean la formación del atenuador. **(f)** Atenuación constante de la transcripción. Siempre se forma el atenuador con independencia de la presencia de triptófano.

7. La inducción de la respuesta SOS no tendría lugar haciendo que las células fuesen más sensibles a los elevados niveles de daño en el DNA.

8. Cada célula de *Salmonella* tendría flagelos formados por ambos tipos de proteína flagelar y la célula sería vulnerable a anticuerpos generados en respuesta a cada una de las proteínas.

9. Se puede haber perdido durante la purificación de la polimerasa un factor disociable necesario para la actividad (por ejemplo, un factor de especificidad similar a la subunidad σ del enzima de *E. coli*).

10.

Proteína Gal4

Dominio de unión al DNA de Gal4	Dominio activador de Gal4

Proteína mutada

Dominio de unión al DNA del represor Lac	Dominio activador de Gal4

La proteína modificada no puede unirse al sitio de fijación de Gal4 en el gen *GAL* (UAS_G) porque carece del dominio de unión al DNA de Gal4. Modifique el sitio de unión al DNA de Gal4p para darle la secuencia de nucleótidos a la cual se une normalmente el represor Lac (utilizando métodos descritos en el Capítulo 9).

11. Metilamina. La reacción tiene lugar con ataque del agua sobre el carbono guanidinio de la arginina modificada.

12. La madre proporciona al huevo el mRNA *bcd* necesario para el desarrollo. El huevo se desarrollará, incluso si su genotipo es bcd^-/bcd^-, siempre que la madre tenga un gen *bcd* normal y el alelo bcd^- sea recesivo. Sin embargo, el adulto bcd^-/bcd^- hembra será estéril porque no tiene un mRNA *bcd* normal para proporcionar a sus propios huevos.

13. **(a)** Se forman puentes de hidrógeno entre la proteína y el armazón de DNA en A106, A110, A118, T119 y A122 y entre la proteína y las

bases del DNA en A106, T107, A118 y T119. Los últimos cuatro nucleótidos contribuyen directamente al reconocimiento de secuencia del DNA. **(b)** *Armazón del DNA:* A106-Arg^{290}, A110-Ser^{212}, A118-Arg^{199}, T119-Arg^{204}, A122-Ser^{308}. *Bases del DNA:* A106-Asn^{253}, T107-Asn^{253}, A118-Asn^{163}, T119-Asn^{163}. Asn, Gln, Glu, Lys y Arg se encuentran a menudo formando puente de hidrógeno con las bases del DNA. La mayoría de residuos en la proteína de unión a TATA que están formando puentes de hidrógeno son Arg y Asn.
(c) TATATATA (residuos 103 a 110)
ATATATAT (residuos 122 a 115)
La proteína de unión a TATA reconoce A106, T107/T110, A118.
(d) Las interacciones hidrofóbicas son numerosas. Muchas interacciones de unión de este tipo implican sepultar grandes cantidades de superficie hidrofóbica.

14. **(a)** Para el 10% de expresión (90% de represión), 10% de represor tiene inductor unido y 90% está libre y disponible para unir el operador. El cálculo utiliza la Ec. 5–8 (p. 156), con $\theta = 0{,}1$ y $K_d = 10^{-4}$ M.

$$\theta = \frac{[\text{IPTG}]}{[\text{IPTG}] + K_d} = \frac{[\text{IPTG}]}{[\text{IPTG}] + 10^{-4}\ \text{M}}$$

$$0{,}1 = \frac{[\text{IPTG}]}{[\text{IPTG}] - 10^{-4}\ \text{M}}\ \text{así}\ 0{,}9[\text{IPTG}] = 10^{-5}\ \text{o}\ [\text{IPTG}] = 1{,}1 \times 10^{-5}\ \text{M}$$

Para 90% de expresión, 90% del represor tiene inductor unido por lo que $\theta = 0{,}9$. Sustituyendo los valores de θ y K_d en la Ec. 5–8 da [IPTG] $= 9 \times 10^{-4}$ M. Así, la expresión génica varía 10 veces en un intervalo de [IPTG] de 10 veces. **(b)** Esperaría que los niveles de proteína fuesen bajos antes de la inducción, aumentaran durante la inducción y a continuación decayesen a medida que cesa la síntesis y se degradan las proteínas. **(c)** Tal como se muestra en (a), el operón *lac* tiene más niveles de expresión que sólo conectado/desconectado; por tanto, no tiene A característico. Tal como se muestra en (b), la expresión del operón *lac* disminuye una vez eliminado el inductor; por tanto carece de la B característica. **(d)** *GFP-on:* rep^{ts} y GFP se expresan a niveles elevados; rep^{ts} reprime OP_A, por lo que no se produce la proteína LacI. *GFP-off:* LacI se expresa a un nivel elevado; LacI reprime OP_{lac} por lo que no se producen ni rep^{ts} ni GFP. **(e)** El tratamiento con IPTG conmuta el sistema de GFP-off a GFP-on. El IPTG sólo tiene efecto cuando está presente LacI por lo que sólo afecta el estado GFP-off. La adición de IPTG alivia la represión de OP_{lac} permitiendo un alto nivel de expresión de rep^{ts}, que inhibe las expresión de LacI y la elevada expresión de GFP. **(f)** El tratamiento térmico conmuta el sistema de GFP-on a GFP-off. El calor sólo tiene efecto cuando está presente rep^{ts}, por lo que sólo afecta el estado GFP-on. El calor inactiva rep^{ts} y alivia la represión de OP_A, permitiendo un elevado nivel de expresión de LacI. A continuación LacI actúa en OP_{lac} para reprimir la síntesis de rep^{ts} y GFP. **(g)** *Característica A:* el sistema no es estable en el estado intermedio. En algún punto, un represor actúa más fuertemente que el otro debido a fluctuaciones al azar en la expresión; esto inhibe la expresión del otro represor y bloquea el sistema en un estado. *Característica B:* una vez se ha expresado un represor, impide la síntesis del otro; así, el sistema permanece en un estado incluso después de que el estímulo hay sido eliminado. **(h)** En ningún momento una célula expresa un nivel intermedio de GFP: esto es una confirmación de la característica A. A la concentración intermedia (X) del inductor, algunas células han pasado a GFP-on mientras que otras aún no han realizado el cambio y permanecen en el estado GFP-off; ninguna está en una situación intermedia. La distribución bimodal de los niveles de expresión a [IPTG] = X está producida por la población mixta de células GFP-on y GFP-off.

Índice alfabético

Las cifras en **negrita** se refieren a la página en que la palabra está destacada en negrita en el texto. Las que van seguidas de una "f", a las figuras, de una "t", a las tablas, de una "r", a los recuadros, y las que van seguidas de una "e" remiten a las fórmulas estructurales.

a

b

C

d

e

f

g

h

I

j

k

l

m

n

o

P

q

r

S

U

V